



杨美英, 王春红, 武志海, 等. 大豆根际溶磷菌分离鉴定及溶磷过程中有机酸的分泌[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(5): 38-44.

大豆根际溶磷菌分离鉴定及溶磷过程中有机酸的分泌

杨美英¹, 王春红¹, 武志海², 岳胜天¹, 付丽¹, 刘晶晶¹, 孙合美¹

(1 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】明确吉林省地区大豆 *Glycine max* 根际溶磷菌的种类及溶磷特点。【方法】利用溶磷圈法筛选溶磷菌, 16S rDNA 序列测定和 Vitek2 生理生化系统对菌株进行分析鉴定。测定菌株生长量、溶磷量、培养基 pH 变化与有机酸的产生。【结果】从大豆根际土壤中分离获得 4 株溶磷菌株 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6。4 个菌株分别属于假单胞菌属 *Pseudomonas* sp.、肠杆菌属 *Enterobacter* sp.、苍白杆菌属 *Ochrobacterum* sp. 和克雷伯菌属 *Klebsiella* sp.。4 株溶磷菌 96 h 内最大溶磷量分别为 558、478、596 和 586 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。甲基红试验和培养物 pH 测定结果表明:4 个菌株在溶磷过程中可使培养物的 pH 下降, 当 pH 小于 4 时, 会明显阻碍菌株的生长。pH 为 5 时, WJ1 和 WJ3 的生长受到轻微的影响, WJ5 和 WJ6 能正常生长。GC-MS 对菌株在溶磷过程中产生的有机化合物的分析表明, 4 菌株均分泌多种有机酸, 其中 α -酮戊二酸在 WJ1、WJ3 和 WJ6 菌株溶磷过程中大量产生。【结论】4 菌株具有较好的溶磷能力, 溶磷过程中分泌有机酸种类不完全相同, 有机酸的分泌造成培养基的 pH 降低, 影响菌体生长, 而菌体数量决定各菌株的溶磷量。

关键词: 大豆; 溶磷菌; pH; 有机酸; 溶磷作用

中图分类号: S828

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2016)05-0038-07

Identification of PSB in soybean rhizosphere and secretion of organic acids in the process of phosphate solubilizing

YANG Meiyong¹, WANG Chunhong¹, WU Zhihai², YUE Shengtian¹, FU Li¹, LIU Jingjing¹, SUN Hemei¹

(1 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2 Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract:【Objective】In order to determine the species and characteristics of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in soybean, *Glycine max*, rhizosphere soil in Jilin Province.【Method】PSB were screened based on the formation of a halo zone of dissolving phosphate, and were identified by 16S rDNA gene sequencing and Vitek 2 system. Bacterial growth rates, soluble phosphorus concentrations, pH changes of the media and the types and amounts of secreted organic acids were determined.【Result】WJ1, WJ3, WJ5 and WJ6 were isolated from soybean rhizosphere soil, and were identified as *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp., *Ochrobacterum* sp. and *Klebsiella* sp. respectively. The maximum soluble phosphorus concentrations within 96 h of inoculating four PSB were 558, 478, 596 and 586 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively. The methyl red tests and pH measurements indicated that media pH all decreased during the phosphate solubilizing process of four PSB. Bacterial growth was limited when pH was below 4. Growth of WJ1 and WJ3 were slightly affected at pH 5, whereas WJ5 and WJ6 grew normally. Various organic compounds secreted from four PSB were analyzed by GC-MS, and among them α -ketoglutaric acid was identified as

收稿日期: 2015-12-10 优先出版时间: 2016-07-05

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160705.1200.034.html>

作者简介: 杨美英(1974—), 女, 副教授, 博士, E-mail: jlaumeiyong@163.com

基金项目: 国家自然科学基金(31201687)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

an abundant compound secreted by WJ1, WJ3 and WJ6. 【Conclusion】All four PSB can effectively solubilize phosphate. The types of organic acids produced by the four PSB are not exactly the same, and the secretion of organic acids causes medium pH to decline, which inhibit the bacterial growth. The number of the bacteria determines the amount of dissolved phosphorus.

Key words: *Glycine max*; phosphate solubilizing bacteria; pH; organic acid; phosphate solubilizing

磷是植物和大部分农作物所需的大量营养元素之一,缺磷会明显抑制植物的生长^[1]。不同物种对磷的需求量从 10 到 100 kg · hm⁻²不等^[2]。而土壤中磷易被转化为磷酸钙 [Ca₃(PO₄)₂]、磷酸铁 (FePO₄) 和磷酸铝 (AlPO₄) 等不溶性磷酸盐,造成土壤中可溶性磷的浓度通常仅为 1 mg · L⁻¹ 或更少^[1-3]。因此,为了增加农作物产量与效益,过度施用磷肥已使我国大部分土壤处于富磷状态。

土壤中大多数溶磷菌 (Phosphate solubilizing bacteria, PSB) 能通过生成有机酸、嗜铁素、矿物酸、质子、腐殖质、CO₂ 和 H₂S 等来释放可溶性磷^[4], 有效提高土壤中植物可利用磷的含量,同时也可以减少化肥的使用^[5]。有研究表明,由于微生物对各种根系信号传导和分泌模式有不同的应答,尤其是当植物处于磷胁迫状态下,微生物群落受不同植物种类的影响较大^[6]。Kobus 等^[7]发现溶磷微生物在土壤中的数量受土壤物理结构、有机质含量、土壤类型、土壤肥力、耕作方式和措施等因素的影响。目前共有 89 种溶磷微生物被鉴定,其中 27 种真菌,58 种细菌和 4 种放线菌。相较于真菌和放线菌,溶磷菌是溶磷微生物的主要种类^[8]。

中国东北黑土区是重要的粮食生产基地,过去的 20 年由于土壤腐蚀和大量施肥,黑土中磷的总量日趋增加^[9],但磷的当季利用率仅有 5.12%^[10]。大豆 *Glycine max* 是该地区主要农作物之一,平均种植面积 2010 年已经增长到 800 万 hm²^[11]。因此,明确黑土区大豆根际溶磷菌的种类与溶磷特点,发现大豆专属生物菌肥的有效菌源,在降低农业生产成本及资源节约利用方面将有重要的意义。但关于东北黑土区溶磷菌的研究报道并不多见。本研究从吉林省地区大豆根际土壤中分离到 4 株优势 PSB,命名为 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6,并对这 4 种菌株的溶磷和产酸特性进行分析比较。

1 材料与方法

1.1 土壤样品及培养基

3 种土壤样品均取自于中国东北吉林省地区(吉

林农业大学大豆试验田,长春市农安县大豆试验地和吉林省公主岭大豆试验地)的大豆根际土壤。NBRIP 液体生长培养基^[12]配方为:10 g · L⁻¹葡萄糖, 5 g · L⁻¹ MgCl₂ · 6H₂O, 0.25 g · L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0.2 g · L⁻¹ KCl, 0.1 g · L⁻¹ (NH₄)₂SO₄ 和 5.0 g · L⁻¹ Ca₃(PO₄)₂ 作为磷源, pH 7。固体培养基需添加 15 g · L⁻¹ 琼脂。改良 NBRIP 培养基: pH 8, 0.5 g · L⁻¹ 蛋白胨代替 0.1 g · L⁻¹ (NH₄)₂SO₄。LB 培养基配方为: 10 g · L⁻¹ NaCl, 10 g · L⁻¹ 胰蛋白胨, 5 g · L⁻¹ 酵母膏。

1.2 PSB 菌株的分离和鉴定

为了从土壤中分离得到 PSB, 每份土样与无菌水按质量比 1:100 混合摇床震荡 1 h。然后将逐级稀释的上清液涂布 NBRIP 固体培养基。28 °C 培养 2 d, 有明显溶磷圈的菌落为 PSB^[13]。在 NBRIP 琼脂平板上进行 3~4 次的纯化培养。纯化后的菌株 -70 °C 条件保存备用。

利用 Vitek2 (bioMerieux, France) 细菌自动分析系统和 16S rDNA 分子生物学技术进行菌株鉴定。分别提取 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6 的总 DNA, 进行 16S rDNA 序列扩增, PCR 所用引物分别对应于大肠埃希菌 (GenBank 序列号为 J01859) 的 7~26 位和 1 512~1 491 位^[14], 上、下游引物序列分别为, 5'-AGAGTTT-GATCATGGCTCAG-3' 和 5'-TACGGTTACCTTGT-TACGACTT-3'。PCR 产物由上海生工生物工程股份有限公司进行测序。GenBank DNA 数据库和 BLAST 程序查找同源序列。

1.3 96 h 细菌溶磷量与生长量的测定

菌株 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6 分别接种在 LB 培养基中, 当培养液细胞浓度为 $D_{600\text{nm}} = 0.6$ 时, 按体积分数为 0.5% 接种于 100 mL 改良 NBRIP 培养基。连续培养 96 h, 每隔 6 h 取样, 标准板计数法测定细胞数量, 钼蓝比色法测定溶磷量。

1.4 细菌生长对培养基 pH 的影响

利用甲基红显色反应检测细菌溶磷过程中改良 NBRIP 培养基 pH 的变化。溶磷菌的培养同“1.3”,

每隔 1 h 取 PSB 菌液 2 mL, 与 100 μL $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甲基红指示剂混合以记录培养基的颜色。利用同样的方法将 4 个菌株的培养液分别接种到 100 mL 改良 NBRIP 培养基和 LB 培养基中, 培养 12 h, 每隔 2 h 取菌液 2 mL, 利用 pH 计记录培养基的 pH。

1.5 培养基初始 pH 对细菌生长的影响

将 LB 液体培养基 pH 分别调至 3、4、5、6、7、8、9, 按上面所述方法向 LB 培养基中接入 4 株分离的菌株, 每隔 2 h 取 1 次菌液, 记录 12 h 内 $D_{600 \text{ nm}}$ 的值。

1.6 PSB 菌株有机酸的提取

为了测定不同 PSB 菌株产有机酸种类, 将 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6 种子液 (同“1.3”) 接种到改良 NBRIP 培养基中培养 24 h 后, 培养液 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。上清液用 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜真空抽滤, 通过转酯作用对样品进行甲酯化反应^[15]。每个样品取 5 mL 滤液与 9 mL 甲醇-硫酸 (体积比 = 10:7) 混合, 60°C 培养 12 h, 待培养液冷却后离心分离, 将 5 mL 甲醇加入到离心后的上清液中, 上清液合并转移到 60 mL 分液漏斗中, 再加入 1 mL 饱和 NaCl 溶液、20 mL 蒸馏水、5 mL 二氯甲烷进行洗涤, 剧烈振荡 60 s 后静置分层。将脱水后的二氯甲烷相在 40°C 水浴条件下利用氮气吹干, 然后准确加入 1 mL 二氯甲烷。以未接种的培养基作对照。样品进行 GC-MS 分析。

1.7 PSB 菌株有机酸的 GC-MS 分析

Agilent 5975c ga 系统装置购于美国 Agilent 公司, 采用 3 轴的 HED-EM 质谱检测系统。Agilent hp-35 弹性石英毛细管柱为 $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 0.25 \mu\text{m}$, 采用氦气为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 的恒速流动模式。柱箱程序升温, 初始温度为 80°C , 保持 2 min, 然后以 $5^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 的速率升温至 280°C , 保持 15 min。通过与 Wiley 7 和 NIST 库匹配的质谱来鉴定成分。

1.8 统计分析

采用 Windows XP 系统中 DPS 统计软件 (12.01 版) 分析数据。

2 结果与分析

2.1 PSB 菌株的分离与鉴定

按照溶磷圈大小, 从大豆根际土壤分离获得 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6 共 4 株溶磷能力较强的菌株。各菌株 16S rRNA 基因序列利用 GenBank DNA 数据库进行 BLAST 同源性比较, 结果表明: 菌株 WJ1 (登

录号 KM975675) 与 *Pseudomonas putida* N-128 (登录号 JN216880.1) 的相似性为 99%; 菌株 WJ3 (登录号 KM975676) 与 *Enterobacter cloacae* subsp. *Cloacae* ENHKU01 (登录号 CP003737.1) 的相似性为 99%; 菌株 WJ5 (登录号 KM975677) 与 *Ochrobacterum haematophilum* ATCC49188 (登录号 NR-074243.1) 的相似性为 98%; 菌株 WJ6 (登录号 KM975678) 与 *Klebsiella pneumoniae* 342 (登录号 CP000964.1) 的相似性为 98%。结合 Vitek 2 自动分析系统结果, 将菌株 WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6 分别鉴定为假单胞菌 *Pseudomonas* sp.、肠杆菌 *Enterobacter* sp.、苍白杆菌 *Ochrobacterum* sp. 和克雷伯菌 *Klebsiella* sp.。

2.2 PSB 菌株溶磷量与生长曲线的变化

为了研究 pH、生长量和溶磷量之间的关系, 将 4 株溶磷菌接种到以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源的改良 NBRIP 培养基中。由图 1 可知, 各菌株的溶磷量和细胞生长量有明显的关系, 当菌株生长量达到最大值时, 溶磷量也趋于最大。溶磷菌 WJ1、WJ3、WJ5、WJ6 经过 6 h 延滞期后, 开始以对数形式增长, 之后分别在 42、36、30 和 30 h 时达到稳定期, 稳定期分别维持在 42~60、36~48、30~54 和 30~54 h。液体培养基中释放的可溶性磷的量随时间的变化逐渐增长, 4 种 PSB 最大溶磷量分别为 558、478、596 和 $586 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。在最初的 12 h 时, WJ5 的溶磷能力都低于其他菌株, 24 h 之后溶磷量明显高于 WJ1 和 WJ3。

2.3 细菌溶磷过程中培养基 pH 的变化

PSB 在溶解磷酸盐过程中能够产酸^[16-17]。虽然磷酸盐溶解的机理仍有许多不明之处, 但已有报道称有机酸的释放导致的 pH 下降可能与溶磷作用相关^[18]。甲基红试验表明: 加入指示剂后, 各菌株的培养物都观察到一致的颜色变化趋势 (图 2): 由黄色变为橙色, 最后变为红色, 但不同菌株菌液达到红色的时间明显不同。菌株 WJ1、WJ3、WJ5、WJ6 分别在 4、3、8 和 2 h 时开始变色, 在 6、17、13 和 4 h 后保持红色不变。由图 3 可知, 在改良 NBRIP 培养基中, 细菌的生长过程伴随明显的 pH 下降。在 12 h 内, 菌株 WJ1、WJ3、WJ6 培养物的 pH 从开始的 8 降到 3~5。12 h 内相对应的 LB 液体培养基的 pH 略有下降, 之后又恢复到最初的数值。菌株 WJ5 在 LB 培养基中培养, 12 h 内培养液 pH 略有下降, 在改良 NBRIP 培养基中培养 12 h 后, 与其他 3 株菌相比, 培养液 pH 下降较小。

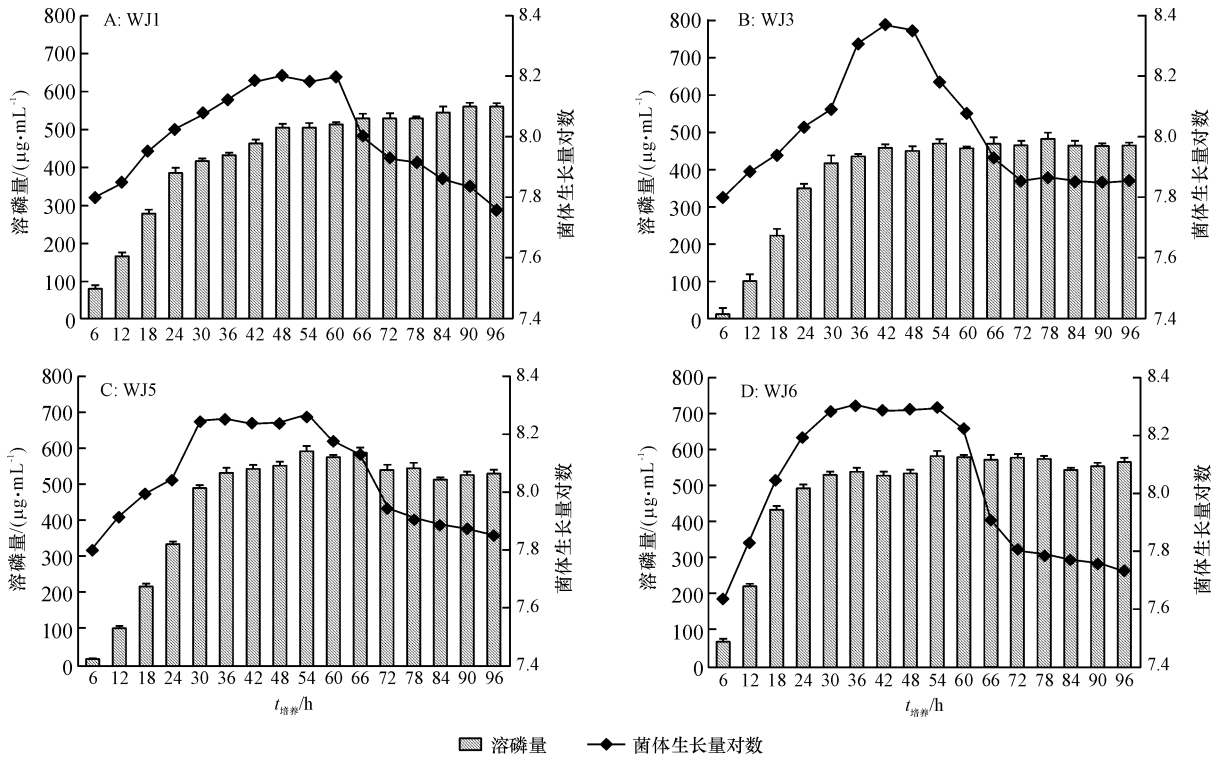


图1 不同溶磷菌在接菌96 h内溶磷量与生长曲线的变化

Fig. 1 The growth of different PSB and the amounts of P released by the PSB within 96 h of inoculation

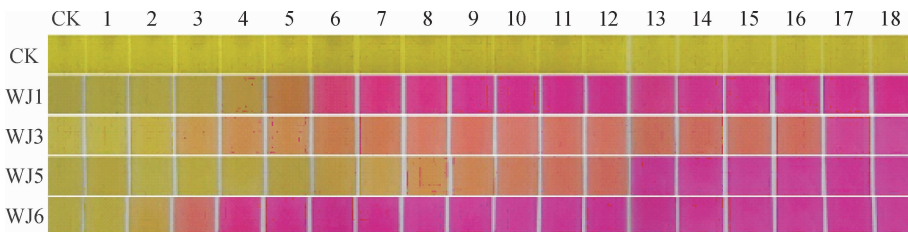


图2 不同溶磷菌的培养基在接菌18 h内的甲基红显色结果

Fig. 2 The methyl red tests of acidification levels of media within 18 h of inoculating different PSB

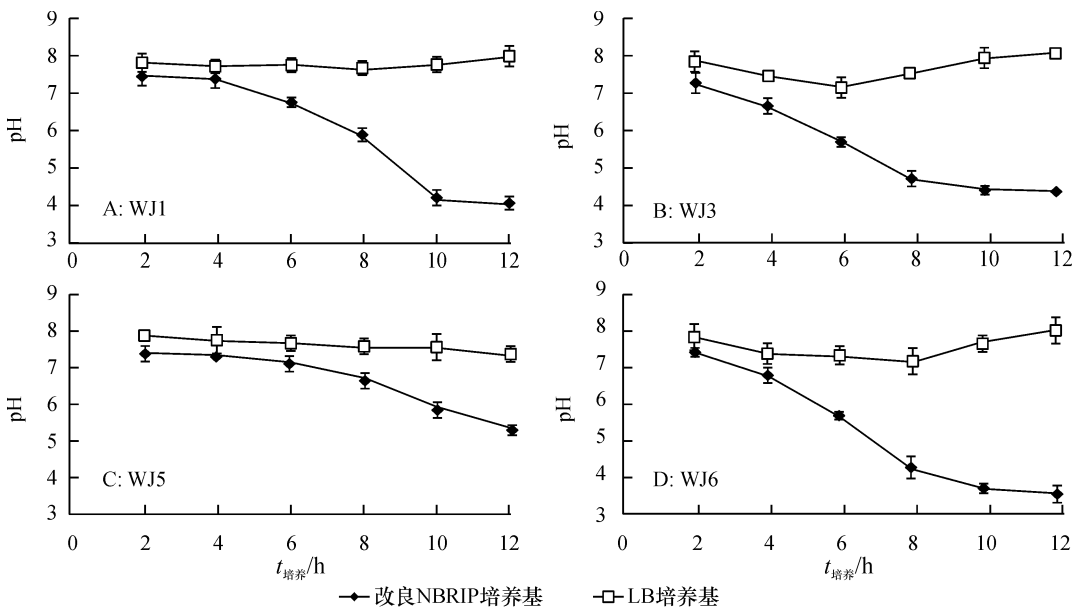


图3 不同溶磷菌在12 h内对改良NBRIP和LB培养基pH的影响

Fig. 3 Changes in pH of modified NBRIP media and LB media within 12 h of incubating different PSB

2.4 培养基初始 pH 对 PSB 菌株生长的影响

为了研究 pH 和细胞生长量之间的关系,在初始 pH 为 3~9 的 LB 培养基中对 PSB 的生长进行了观测。由图 4 可知,各 pH 条件下,WJ1、WJ3、WJ5 和 WJ6 的细胞生长趋势相似。培养基 pH 低于 4 时,各菌株生长量明显下降。pH 为 5 的条件下,WJ1 和 WJ3 的生长轻微减缓,而 WJ5 和 WJ6 仍正常生长。

2.5 PSB 溶磷过程中产有机酸的分析

对 4 菌株 24 h 培养物中的有机化合物进行 GC-MS 分析。表 1 显示,WJ1、WJ3、WJ5、WJ6 菌株的培养滤液中分别检测到 6、8、8 和 7 种有机化合物,这

些有机化合物中包含了不同种类的有机酸。其中,乙酰丙酸的相对含量最高,但其是对照中检测到的仅有的有机酸成分,因而不能认定乙酰丙酸为 PSB 菌株溶磷过程中产生的。2,2-二甲氧基丙酸是 4 种菌株培养滤液中另一种共有的成分,相对于检测到的化合物总量所占百分比分别为:1.52%、2.36%、4.04% 和 3.44%。WJ1、WJ3、WJ6 培养滤液中 α -酮戊二酸的相对含量较高,分别达到 21.46%、26.53% 和 23.80%。此外,WJ3 与 WJ6 还检测到 3 种相同的物质,包括 bis-(methoxycarbony) ethoxyiminomethane、琥珀酸、柠檬酸。

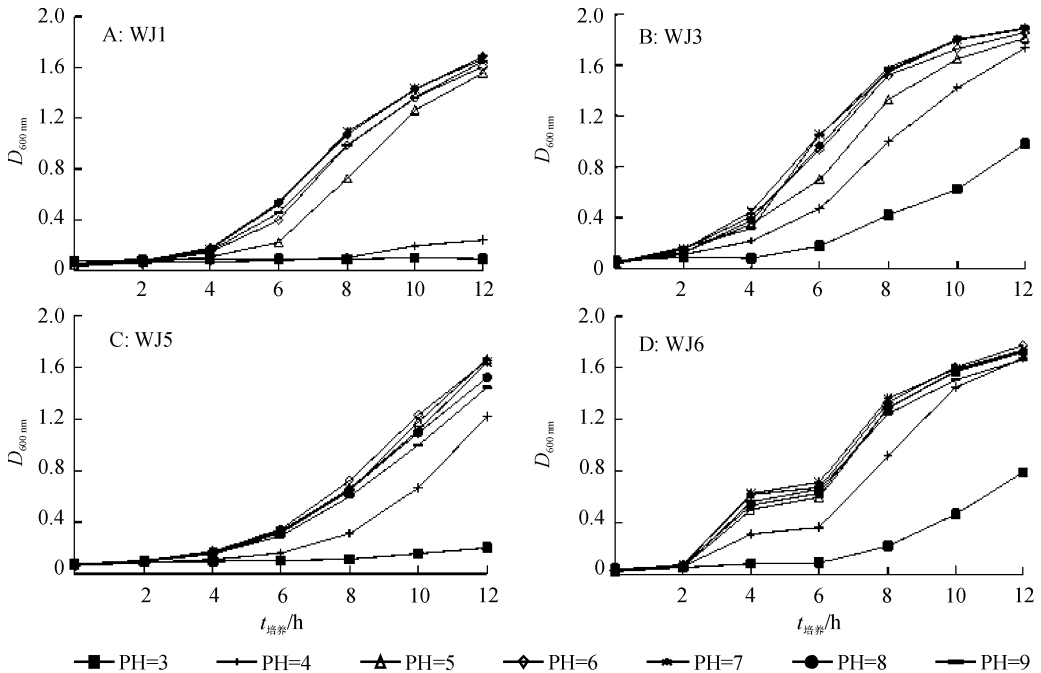


图 4 不同溶磷菌在不同初始 pH LB 培养基中的生长曲线

Fig. 4 The growth curves of different PSB in LB media with different initial pH

表 1 不同溶磷菌溶磷 24 h 培养物中的有机化合物相对含量¹⁾

Tab.1 Relative contents of organic compounds secreted from different PSB during 24 h of cultivation %

菌株	乙酰丙酸	2,2-二甲氧基丙酸	α -酮戊二酸	bis-(methoxycarbony) ethoxyiminomethane	2,4-己二烯二羧酸	琥珀酸	苹果酸
WJ1	70.21	1.52	21.46	2.80	2.15
WJ3	54.78	2.36	26.53	3.77	...	5.28	1.23
WJ5	88.01	4.04	2.60	...	0.65
WJ6	44.58	3.44	23.80	3.45	...	3.69	...

菌株	柠檬酸	hepta-2,4-dienoic acid	3-羟基癸酸	2-咪喃酮	乙酸	2,6-二叔丁基对甲酚	ethanedione, di-2-furanyl
WJ1	1.87
WJ3	4.38	1.68
WJ5	...	9.11	...	0.42	0.83	1.03	...
WJ6	2.59	18.47

1) ...表示未检测到。

3 讨论与结论

植物从土壤吸收磷的主要形式为磷酸根离子(H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-}),但土壤中的大多数磷酸盐不易溶解^[19]。多种细菌及真菌具有将不溶磷酸盐转化成植物可利用的磷的能力^[20]。本研究中我们报道了从大豆根际土壤中分离到4种优势PSB株,分别鉴定为假单胞菌属(WJ1)、肠杆菌属(WJ3)、苍白杆菌属(WJ5)、克雷伯菌属(WJ6)PSB菌株。菌株WJ1、WJ3、WJ5和WJ6在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源的液体培养基中培养96h,最大溶磷量均高于赵小蓉等^[21]报道的溶磷菌的溶磷量。细菌WJ1、WJ3和WJ6已经被确认为有高效溶磷能力的溶磷微生物^[22-23],但苍白杆菌属的溶磷特性及机制报道较少。本试验研究结果表明WJ5是1株具有分泌有机酸、高耐酸性的溶磷菌株。

甲基红试验和pH测定结果表明:PSB溶磷过程中pH会不断下降,pH降低到一定值时溶磷量也不再增加,这与菌株*Ps. fluorescens* RAF15表现的规律基本一致^[9]。GC-MS对培养基上清液中有有机酸的测定结果证实,pH的下降是有机酸分泌的结果。PSB耐酸性的强弱决定了细胞数量,而当细胞数量较多、生长稳定期较长,则溶磷量较大。菌株WJ5和WJ6具有更好的耐酸性,且WJ5分泌酸比较晚,有利于菌体生长;菌株WJ6的生长表现出更长的稳定期。因此,WJ1、WJ3、WJ5和WJ6产酸对于溶磷是1个必要条件,但是不同PSB菌株的溶磷能力依赖于活细胞的数量和其耐酸性。

不同溶磷微生物有多种溶磷机制^[19],通过分泌有机酸实现溶磷仍是大多数溶磷菌株的主要机制^[24]。柠檬酸、乙酸、苹果酸和琥珀酸是溶磷过程中共有的有机酸,在许多不同的PSB培养滤液中都能检测到^[1,17],但溶磷真菌*Penicillium* sp.溶磷过程中没有发现有大量有机酸的产生^[25]。一些研究者认为磷的分解不仅是由有机酸和质子的释放引起的,此过程还伴随着 NH_4^+ 的同化作用^[26]。本研究中GS-MS分析得出,4菌株在溶磷过程都伴随有机酸的产生,且种类不同。除去2,2-二甲基氧丙酸为共有的有机酸外,WJ5中发现的2,4-己二烯二羧酸,hepta-2,4-dienoic acid和3-羟基葵酸鲜有报道。相对于其他菌株,WJ5中hepta-2,4-dienoic acid的相对含量较高。WJ6的培养滤液中ethanedione,di-2-furanyl的相对含量较高,但比 α -酮戊二酸的低。而且4个

菌株产生有机酸的种类和比例差别较大,化合物的类型和相对含量表明由磷酸盐溶解诱导的代谢途径在4个菌株中不完全相同。

本试验从东北大豆根际土壤中分离获得4株溶磷菌株WJ1、WJ3、WJ5和WJ6,分别被鉴定为假单胞菌属、肠杆菌属、苍白杆菌属和克雷伯氏菌属。4株溶磷菌96h内最大溶磷量分别为558、478、596和586 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。4个菌株均分泌有机酸,但有机酸种类不完全相同,有机酸的分泌造成培养基pH降低,pH低于4时,明显影响溶磷菌的数量,而菌体数量多,菌体在平台期维持的时间较长,溶磷量较大。

参考文献:

- [1] VYAS P, ARVIND G. Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing *Pseudomonas fluorescens*[J]. BMC Microbiol, 2009, 9(1): 174-188.
- [2] YADAV B K, TARAFDAR J C. Ability of *Emericella rugulosa* to mobilize unavailable P compounds during Pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R. Br.] crop under arid condition[J]. Indian J Microbiol, 2007, 47(1): 57-63.
- [3] CHUNG H K, PARK M S, MUNUSAMY M H Y. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea[J]. Soil Biol Biochem, 2005, 37(10): 1970-1974.
- [4] 孙振宁, 段兴武, 谢云. 东北典型黑土供肥量与大豆肥料利用率[J]. 中国农学通报, 2012, 28(15): 46-51.
- [5] YANG P X, MA L, CHEN M H, et al. Phosphate solubilizing ability and phylogenetic diversity of bacteria from P-rich soils around Dianchi Lake drainage area of China [J]. Pedosphere, 2012, 22(5): 707-716.
- [6] RODRIGUEZ H, REYNALDO F. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion[J]. Biotechnol Adv, 1999, 17(4/5): 319-339.
- [7] KOBUS J. The distribution of microorganisms mobilizing phosphorus in different soils [J]. Acta Microbiol Pol, 1962, 11: 255-264.
- [8] LIU H, WU X Q, REN J H, et al. Isolation and identification of phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China [J]. Pedosphere, 2011, 21(21): 90-97.
- [9] PARK K H, LEE C Y, SON H J. Mechanism of insoluble phosphate solubilization by *Pseudomonas fluorescens* RAF15 isolated from ginseng rhizosphere and its plant

- growth-promoting activities [J]. *Lett Appl Microbiol*, 2009, 49(49): 222-228.
- [10] 段兴武, 赵振, 刘刚. 东北典型黑土区土壤理化性质的变化特征[J]. *土壤通报*, 2012, 43(3): 529-534.
- [11] 薛庆喜. 中国及东北三省30年大豆种植面积、总产、单产变化分析[J]. *中国农学通报*, 2013, 29(35): 102-106.
- [12] PARK J H, NANTHI B, MALLAVARAPU M, et al. Concomitant rock phosphate dissolution and lead immobilization by phosphate solubilizing bacteria (*Enterobacter* sp.) [J]. *J Environ Manage*, 2011, 92(4): 1115-1120.
- [13] NAUTIYALA C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. *FEMS Microbiol*, 1999, 170(1): 265-270.
- [14] YANG M Y, LI W M, GUO X X, et al. Isolation and identification of a carbazole degradation gene cluster from *Sphingomonas* sp. JS1 [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(9): 1625-1631.
- [15] 谢文明, KO K Y, LEE K S. 土壤和白菜中低分子量有机酸的气相色谱分析[J]. *岩矿测试*, 2009, 28(2): 97-100.
- [16] LIN T F, HUANG H I, SHEN F T, et al. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC-A174 [J]. *Bioresource Technol*, 2006, 97(7): 957-960.
- [17] HOBERG E, MARSCHNER P, LIEBEREI R. Organic acid exudation and pH changes by *Gordonia* sp. and *Pseudomonas fluorescens* grown with P adsorbed to goethite [J]. *Microbiol Res*, 2005, 160(2): 177-187.
- [18] FUENTES B, JORQUERA M, MORA M L. Dynamics of phosphorus and phytateutilizing bacteria during aerobic degradation of dairy cattle dung [J]. *Chemosphere*, 2009, 74(2): 325-331.
- [19] ANTOUN H. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture [J]. *Procedia Eng*, 2012, 46(3): 62-67.
- [20] PATEL D K, MURAWALA P, ARCHANA G, et al. Repression of mineral phosphate solubilizing phenotype in the presence of weak organic acids in plant growth promoting fluorescent pseudomonads [J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 3055-3061.
- [21] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展 [J]. *土壤肥料*, 2001, 56(3): 7-11.
- [22] PARK J H, NANTHI B, MALLAVARAPU M, et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil [J]. *J Hazard Mater*, 2011, 185(2/3): 829-836.
- [23] TOFAZZAL-ISLAMA M, DEORAA A, HASHIDOKOYA Y, et al. Isolation and identification of potential phosphate solubilizing bacteria from the rhizoplane of *Oryza sativa* L. cv. BR29 of Bangladesh [J]. *Z Naturforsch C*, 2007, 62(1/2): 103-110.
- [24] KHAN M S, ZAIDI A, WANI P A. Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture: A review [J]. *Agron Sustain Dév*, 2007, 27(1): 29-43.
- [25] ILLMER P, SCHINNER F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil [J]. *Soil Biol Biochem*, 1992, 24(4): 389-395.
- [26] ILLMER P, SCJOMMER F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms [J]. *Soil Biol Biochem*, 1995, 27(3): 257-263.

【责任编辑 庄延, 柴焰】