



## 麦田土壤解磷细菌的筛选及其解磷能力研究

孙亚钦<sup>1</sup>, 叶盛嘉<sup>1</sup>, 范国安<sup>1,2</sup>, 张影<sup>1</sup>, 刘星<sup>1</sup>, 吴大付<sup>1</sup>, 王菲<sup>1</sup>

(1. 河南科技学院 资源与环境学院, 河南新乡 453003; 2. 新疆农业大学 草业与环境科学学院, 乌鲁木齐 830052)

**摘要** 选用以植酸钙为磷源的培养基, 对麦田土壤中的解磷细菌进行分离筛选, 利用 16S rRNA 基因测序技术鉴定解磷细菌种类并构建系统进化树, 根据培养液的实际 pH 测定其磷酸酶活性, 利用溶磷圈法和钼锑抗比色法对其解磷能力进行测定。从麦田土壤中共筛选鉴定出 5 株解磷菌株, 分别隶属于 *Bacillus*、*Arthrobacter* 和 *Pseudarthrobacter*; 5 株解磷菌株对应的培养液 pH 显著下降, 实际磷酸酶活性为 5.18~6.39  $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ , 从植酸钙中活化出的速效磷含量为 2.49~3.55  $\text{mg}/\text{L}$ , 活化率为 19.28%~43.54%, 其对应培养液中的磷酸酶活性与 pH 以及速效磷含量之间分别呈现极显著的负相关关系和正相关关系。结果表明解磷能力最强的是菌株 FLP36, 属于 *Bacillus*。

**关键词** 解磷细菌; 溶磷圈; 有机磷; 磷酸酶活性; 解磷能力

**中图分类号** S154.3; S182

**文献标志码** A

**文章编号** 1004-1389(2022)03-0379-09

在植物的生长发育过程中, 磷不仅是植物体内多种重要化合物的组分, 而且还参与糖等重要物质的代谢过程。由于磷在土壤中移动性小且固定性高, 农业生产中磷肥的大量施用在保证粮食生产持续稳步增长的同时, 也对生态环境造成一定风险, 这种以环境为代价来换取粮食高产的方式已不符合农业绿色发展的战略。因此, 充分挖掘土壤本身的生物学潜力是提高作物磷素利用的一种有效方式, 对实现“产出高效、产品安全、资源节约、环境友好”的现代农业发展之路有重要意义。

土壤中存在大量的微生物(全球约为  $4 \times 10^{30} \sim 5 \times 10^{30}$ )<sup>[1]</sup>, 特别是与磷素循环相关的微生物, 在土壤磷素活化和植物磷养分吸收过程中扮演着重要角色<sup>[2-3]</sup>。在如此丰富的微生物中, 有一类能够通过利用自身代谢产物或者与其他生物的协同作用, 将土壤中难溶性的磷酸盐转化为植物可吸收利用的磷酸盐, 这类微生物叫做解磷微生物(Phosphate-solubilizing microorganisms, PSM), 包括细菌、真菌和放线菌, 但从数量和种类上来讲, 解磷细菌在解磷微生物中所占的比重最大<sup>[4]</sup>。据统计, 解磷细菌可占到土壤可培养细

菌的 40% 左右<sup>[5]</sup>, 而且解磷潜力可达到整个微生物群体的 50%<sup>[4]</sup>, 是与磷的活化和周转密切相关的一类。因此, 筛选高效的解磷菌株对提高磷肥利用率和实现农业绿色发展具有重大意义。国内外已经有许多学者对解磷细菌的分离筛选、鉴定、解磷效果等方面进行了大量研究, 如冯哲叶<sup>[6]</sup>筛选具有较好解磷能力的解磷细菌, 并将其与有机肥共同接种于盆栽中, 发现大豆植株的茎粗、株高、叶宽和生物量有显著的提高, 并且对磷素的积累有明显的增加; 唐岷宸等<sup>[7]</sup>将解磷细菌接种于盆栽黑叶葵扇白菜中, 其鲜质量增加 65.5%, 叶片全磷含量增加 46.9%。这些研究表明解磷细菌不仅可以提高植物对磷的吸收利用, 还能促进土壤有益微生物的代谢活动, 改善植物根际环境, 从而达到增产效果。因此, 通过利用土壤中的解磷微生物来调控土壤-植物的磷素循环是一种极佳的方式。同时, 筛选高效的解磷细菌并对其解磷能力进行探索, 对于提高磷肥利用率和改善植物的磷营养状况以及改善土壤条件意义重大。

许多有关解磷细菌分离筛选的研究都是以难溶性无机磷  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  作为唯一磷源来开展的<sup>[8-13]</sup>, 而土壤中占全磷 29%~90% 的有机磷<sup>[14]</sup>

**收稿日期:** 2021-04-12 **修回日期:** 2021-08-09

**基金项目:** 国家自然科学基金(31872184); 河南科技学院大学生创新训练计划(2021CX45); 河南科技学院高层次人才科研项目(2016031)。

**第一作者:** 孙亚钦, 男, 硕士研究生, 研究方向为植物-解磷细菌互作。E-mail: yaqinsun0622@stu.hist.edu.cn

**通信作者:** 王菲, 女, 博士, 副教授, 研究方向为根际/菌丝际微生物互作增强土壤有机磷活化。E-mail: wangfei@hist.edu.cn

也可以通过解磷细菌的酶解作用转化成植物能够吸收利用的无机磷<sup>[15]</sup>,但对于解有机磷细菌的分离筛选等方面的研究还较少。因此,本文通过对麦田土壤中解有机磷细菌的分离筛选及其解磷能力分析,以期了解具有解有机磷功能的细菌种类,为解磷细菌活化土壤有机磷的相关研究提供理论基础,同时也为丰富解磷微生物资源库提供高效的菌株资源以及微生物肥料的应用提供一定的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 土壤的采集与处理

土壤样品采自河南省林州市姚村镇的小麦田(113.8°E,36.17°N),采用五点取样法,去除表层可见的动植物残体,用土钻取0~20 cm深度的麦田土壤,并装入无菌袋中,放于4℃冰盒内带回实验室,再将五个样点的麦田土壤混匀并过筛(2 mm),采用四分法收集约200 g的土壤放入样品采集袋中,置于4℃冰箱中保存,备用。

### 1.2 培养基的配制

有机磷固体培养基参考国际植物研究所磷酸盐生长培养基(National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium, NBRIP)<sup>[16]</sup>,成分和含量稍作调整,葡萄糖( $C_6H_{12}O_6$ )10 g/L,植酸钙(Phytin)2 g/L,氯化镁( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ )5 g/L,硫酸镁( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ )0.25 g/L,氯化钾(KCl)0.2 g/L,硫酸铵 $[(NH_4)_2SO_4]$ 0.1 g/L,琼脂粉15 g/L,有机磷液体培养基则不需要加入琼脂粉,pH 7.0。Luria-Bertani(LB)液体培养基成分和含量:胰蛋白胨10 g/L,酵母提取物5 g/L,氯化钠10 g/L,pH 7.0。所有培养基在使用前都需要在121℃下灭菌30 min。

### 1.3 解磷细菌的分离和纯化

利用平板稀释法及选择性有机磷培养基对麦田土壤中的解磷细菌进行分离筛选。具体操作如下:在超净工作台中称取新鲜土壤样品5 g于无菌离心管中,用无菌水定容至50 mL,振荡20 min,使土样均匀地分散在稀释液中成为土壤悬液,然后按10倍梯度依次进行稀释,用移液枪吸取 $10^{-4} \sim 10^{-6}$  3个稀释度的样品各0.1 mL,均匀涂布于有机磷固体培养基上,每个梯度重复3次,最后在28℃恒温培养箱中倒置培养并观察平板中菌落生长状况及透明圈的产生情况。

用接种环挑取具有溶磷圈且未发生重叠的菌落,在新的有机磷固体培养基上按照Z字形划线纯化,28℃恒温培养箱中倒置培养,直至得到纯菌株,然后置于4℃冰箱中保存。

### 1.4 菌株解磷能力的分析

1.4.1 溶磷圈的测定 将分离纯化得到的纯菌株点接于有机磷固体培养基上,置于28℃恒温培养箱中倒置培养3 d,观察溶磷圈产生情况,并选取互相垂直的方向分别测量溶磷圈直径( $D$ )和菌落直径( $d$ ),分别计算溶磷指数( $PSI$ )( $PSI = D/d$ )和溶磷效率( $PSE$ )( $PSE = (D - d)/d \times 100\%$ )以便于对各菌株的解磷能力进行初步判断<sup>[17-18]</sup>。

1.4.2 解磷能力的定量分析 将筛选得到的菌株接种于LB液体培养基中,于37℃、180 r/min振荡培养20 h,600 nm波长下测量菌液的OD值,使其 $OD_{600} = 0.6$ ,然后在5 000 r/min下离心3 min,弃上清液后,用0.85%的NaCl溶液清洗菌体3次,再用0.85%的NaCl溶液定容至15 mL,充分摇匀后用移液枪从中吸取1 mL菌悬液加到有机磷液体培养基中,以不接种菌液的处理为对照,每个菌株重复3次,于37℃、180 r/min振荡培养12 h,随后于12 000×g离心2 min,吸取10 mL上清液测定培养液pH,另外吸取1 mL上清液作为待测液,采用钼锑抗比色法测定培养液中速效磷的含量<sup>[19]</sup>,并计算植酸钙的活化率[活化率=(接种菌液样品中的速效磷含量-不接种菌液样品中的速效磷含量)/接种菌液样品中的速效磷含量×100%],然后再吸取1 mL上清液作为待测液,根据培养液pH,以对硝基苯磷酸二钠(p-NPP,150 mmol/L)作为反应底物测定培养液中的磷酸酶活性<sup>[20]</sup>。

### 1.5 菌株鉴定

1.5.1 细菌基因组DNA的提取 采用AxyPrep细菌基因组DNA小量制备试剂盒(Axygen,USA)提取细菌的基因组DNA,具体步骤按照操作说明进行。

1.5.2 细菌基因组PCR扩增 采用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R(5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')对基因组DNA进行扩增,PCR扩增反应体系(50 μL)如下:基因组DNA(20 ng/μL)1.0 μL,10×Buffer(含2.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ )5.0 μL,Taq聚合酶(5 U/μL)1.0 μL,dNTP(10 μmol/L)1.0

μL,27F 引物(10 μmol/L)1.5 μL,1492R 引物(10 μmol/L)1.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 39 μL。

PCR 反应程序:95 ℃ 预变性 5 min;95 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物取 3 μL 用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,确认 PCR 扩增片段。

1.5.3 PCR 产物的纯化 PCR 产物用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收,具体步骤按照操作说明进行。

1.5.4 序列测定 取各个样品纯化后的 PCR 产物,在上海派森诺生物科技股份有限公司利用 ABI3730XL 测序仪进行双向测序。

1.5.5 序列分析 利用 ChromasPro 软件截去无效序列后,再用 BioEdit 软件对双端有效序列进行拼接,然后以 Blast 程序将合格序列与 NCBI 数据库中的序列进行比对,获得与待测菌株序列相似性最大的菌株信息,即为鉴定结果,并将序列上传至 GenBank 数据库获得序列号。最后利用 MEGA 7.0 软件<sup>[21]</sup>对所获得的菌株序列以及与其相似性较高的 16S rRNA 基因序列进行排列并采用 Neighbor-joining 方法<sup>[22]</sup>构建系统进化树。

### 1.6 数据统计

采用 Microsoft Excel 2016 软件对数据进行整理,并计算平均值和标准误,采用 SPSS 26.0 统计软件对数据进行单因素方差分析和 Pearson 相关性分析,通过新复极差法(Duncan's)来比较差异的显著性( $P<0.05$ ),最后用 Microsoft Excel 2016 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株解磷能力的定性分析

通过对解磷细菌 *PSI* 与 *PSE* 的计算(表 1),发现菌株 FLP36 的 *PSI* 和 *PSE* 最大,显著高于其他菌株;菌株 FLP37 和 FLP50 的 *PSI* 及 *PSE* 居中,而且两者之间无显著性差异,但均显著高于菌株 FLP69 和 FLP72;而菌株 FLP69 的 *PSI* 和 *PSE* 最小,显著低于其他菌株。同样,根据各菌株的溶磷圈也可以直观地判断出其解磷能力的强弱(图 1)。

表 1 不同菌株的溶磷指数和溶磷效率

Table 1 P solubilization index and P solubilization efficiency of different strains

| 菌株编号<br>Number of strains | 溶磷圈直径/mm<br>Diameter of halo | 菌落直径/mm<br>Diameter of colony | <i>PSI</i> | <i>PSE</i> /% |
|---------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------|---------------|
| FLP36                     | 4.0±0.0 d                    | 1.0±0.0 c                     | 4.0±0.03 a | 303.3±3.33 a  |
| FLP37                     | 7.2±0.1 b                    | 2.1±0.1 b                     | 3.5±0.06 b | 250.3±5.51 b  |
| FLP50                     | 10.6±0.6 a                   | 3.2±0.1 a                     | 3.3±0.08 b | 227.7±7.66 b  |
| FLP69                     | 4.8±0.2 cd                   | 2.4±0.1 b                     | 2.0±0.02 d | 101.5±1.52 d  |
| FLP72                     | 5.3±0.2 cd                   | 2.2±0.2 b                     | 2.5±0.16 c | 148.3±15.90 c |

注:数据( $n=3$ )为“平均值±标准误”。不同小写字母代表解磷菌株间的差异达到显著水平( $P<0.05$ )。

Note:Data( $n=3$ ) are the “mean±standard error”(SE). Values followed by different lowercase letters within the columns indicate significant differences among strains at the  $P<0.05$  level by one-way ANOVA.

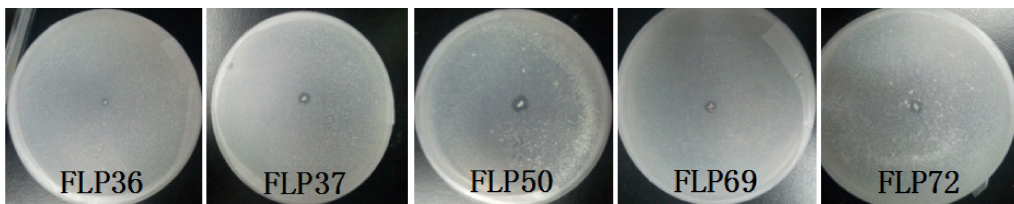


图 1 不同解磷菌株产生的溶磷圈

Fig. 1 Phosphate-solubilization halo produced by different strains

### 2.2 解磷菌株培养液 pH 的变化和磷酸酶活性

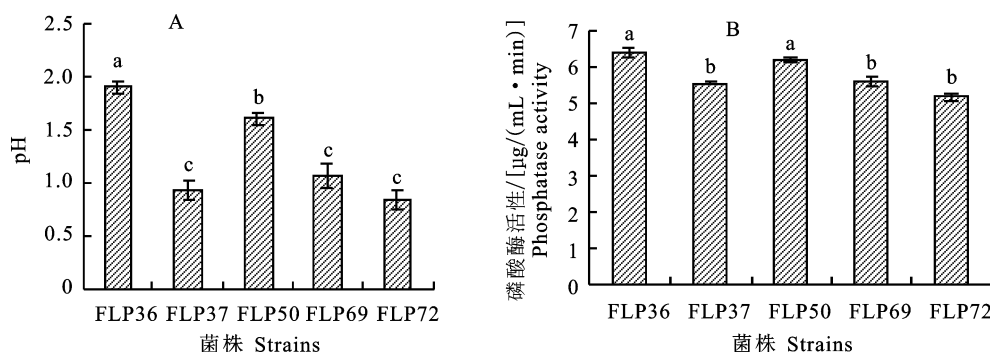
在培养液中接种解磷菌株并培养 12 h 后,培养液 pH 与初始 pH 相比均有不同程度的下降,以培养液中初始 pH 与培养后 pH 的差值来表示

pH 的变化幅度。从图 2-A 中可以看出 5 株解磷菌株培养液中的 pH 变化幅度在 0.8~1.9,其中菌株 FLP36 对应的培养液 pH 变化幅度显著高于其他菌株,菌株 FLP37、FLP69 和 FLP72 对应

的培养液 pH 变化幅度之间不存在显著性差异, 但均显著低于菌株 FLP36 和 FLP50。

根据培养液的 pH, 测定其磷酸酶活性, 更能真实地反映培养液的实际磷酸酶活性的变化情况。5 株解磷菌株培养液中的磷酸酶活性在

5.18~6.39  $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ , 菌株 FLP36 和 FLP50 对应的培养液中的磷酸酶活性显著高于其他菌株, 但两者之间无显著性差异, 菌株 FLP37、FLP69 和 FLP72 对应的培养液中的磷酸酶活性之间也无显著性差异(图 2-B)。



不同小写字母代表解磷菌株间的差异达到显著水平 ( $P < 0.05$ ), 下同

Different lowercase letters indicate significant differences among strains at the  $P < 0.05$  level, the same below

图 2 不同菌株对应的培养液中 pH 的变化和磷酸酶活性

Fig. 2 Variation of pH and phosphatase activity in fluid medium corresponding to different strains

### 2.3 菌株解磷能力的定量分析

根据培养液中速效磷含量的多少可以判断菌株的解磷能力。从图 3-A 可以看出, 5 株解磷菌株从植酸钙中活化出来的速效磷含量为 2.49~3.55 mg/L, 其中菌株 FLP36 对应的培养液中速效磷含量最高, 显著高于菌株 FLP37 和 FLP72; 菌株 FLP50 和 FLP69 对应的培养液中速效磷含量居中, 且两者之间无显著性差异, 但均显著高于

菌株 FLP72。

如图 3-B 所示, 5 株解磷菌株对植酸钙的活化率为 19.28%~43.54%, 其中菌株 FLP36 对植酸钙的活化率最高, 显著高于菌株 FLP37 和 FLP72, 而与菌株 FLP50 和 FLP69 之间并无显著性差异; 菌株 FLP37 对植酸钙的活化率显著高于菌株 FLP72。

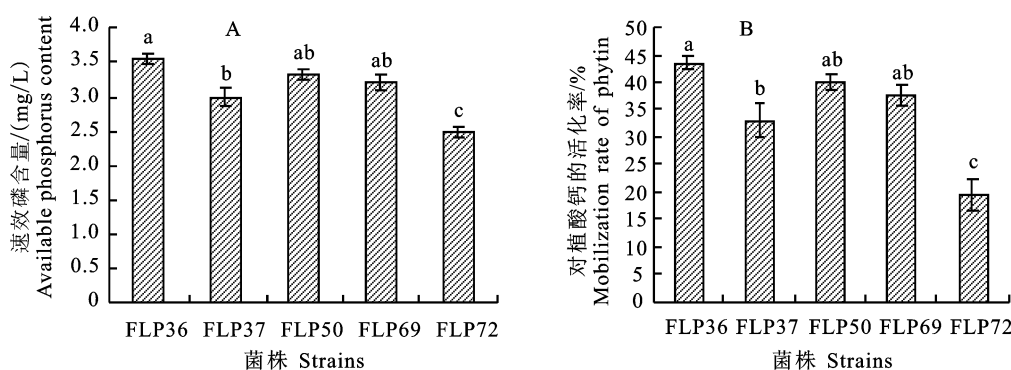


图 3 不同菌株从植酸钙中活化出的速效磷含量以及对植酸钙的活化率

Fig. 3 Content of available phosphorus from phytin mobilized by different strains and mobilization rate of phytin

### 2.4 培养液中磷酸酶活性与 pH 以及速效磷含量的关系

培养液中 pH 与磷酸酶活性之间存在极显著的负相关关系(图 4-A), 即 pH 下降的幅度越大, 其对应的磷酸酶活性也就越高; 而磷酸酶活性与速效磷含量之间存在极显著的正相关关系(图 4-

B), 即磷酸酶活性越高, 从植酸钙中活化出的速效磷含量也越高。

### 2.5 解磷菌株的分子鉴定

结合平板稀释法、16S rRNA 基因测序以及同源序列比对, 鉴定出菌株 FLP36 属于 *Bacillus*, 菌株 FLP37、FLP50 和 FLP69 同属于 *Ar-*

*throbacter*, 菌株 FLP72 为 *Pseudarthrobacter*。将这些菌株的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank 中获得的序列号分别为 MW131227、MW131228、MW131229、MW131231 和 MW131232(表 2)。

将筛选获得的 5 株解磷菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中的序列比对同源性高的模式菌株序列构建系统进化树(图 5),结果发现这 5 株解磷菌株隶属于 3 个属(*Arthrobacter*、*Bacil-*

*lus* 和 *Pseudarthrobacter*)。其中菌株 FLP36 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)聚为一支,表明二者之间有较近的亲缘关系;菌株 FLP37 和 FLP69 分别与两个 *Arthrobacter* 的菌株聚为一支,表明这两个菌株与节杆菌属的亲缘关系更近,而属于 *Arthrobacter* 的菌株 FLP50 则与属于 *Pseudarthrobacter* 的菌株 FLP72 有较近的亲缘关系。

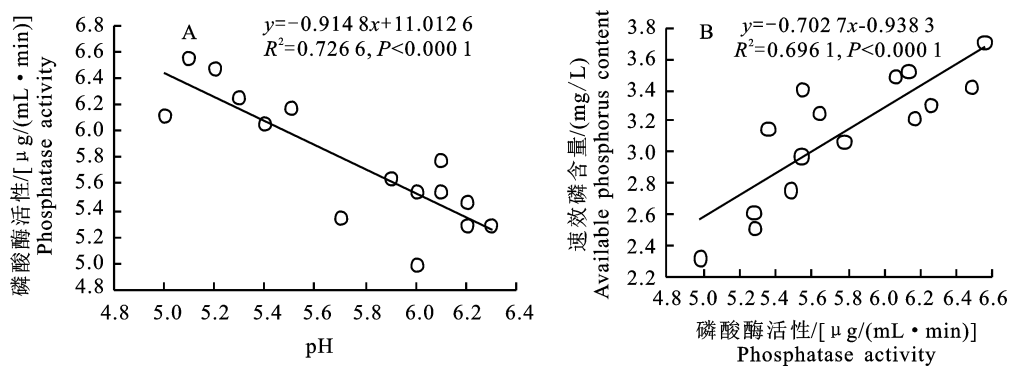


图 4 培养液中磷酸酶活性与 pH 以及速效磷含量的关系

Fig. 4 Correlations between phosphatase activity and pH, available phosphorus content

表 2 不同菌株在 NCBI 中的比对结果

| 菌株编号              |  | 菌株名称                                        | 相似性/%          | 序列号              |
|-------------------|--|---------------------------------------------|----------------|------------------|
| Number of strains |  | Name of strain                              | Identification | Accession number |
| FLP36             |  | <i>Bacillus megaterium</i>                  | 99             | MW131227         |
| FLP37             |  | <i>Arthrobacter humicola</i>                | 99             | MW131228         |
| FLP50             |  | <i>Arthrobacter defluvii</i>                | 99             | MW131229         |
| FLP69             |  | <i>Arthrobacter oryzae</i>                  | 98             | MW131231         |
| FLP72             |  | <i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> | 99             | MW131232         |

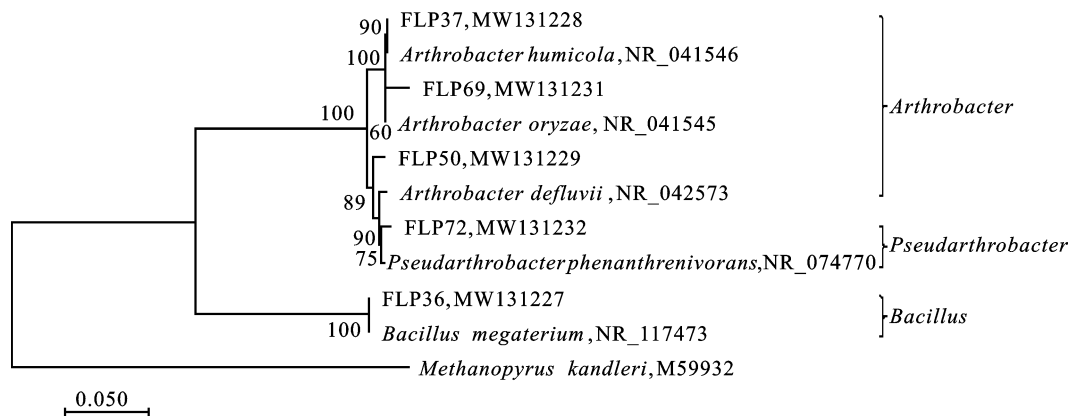


图 5 基于 16S rRNA 基因序列构建的解磷菌株系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic tree of phosphate-solubilizing strains based on 16S rRNA gene sequences

### 3 讨论

利用平板培养对解磷细菌进行分离是一种简单有效的方法,解磷细菌将培养基中的植酸钙溶解产生溶磷圈,通过对溶磷圈的大小进行测量,以此可以初步估测微生物的解磷能力。本研究中分离筛选出来的 5 株解磷细菌在植酸钙培养基上均产生明显的溶磷圈,说明筛选培养出来的细菌均具有降解有机磷的能力,而且通过对溶磷指数(PSI)和溶磷效率(PSE)的分析,可以初步判定菌株 FLP36 降解有机磷的能力最强。进而对培养液中速效磷含量的分析也发现菌株 FLP36 从植酸钙中活化出的速效磷含量最高,并且对植酸钙的活化率也最高。这些结果都表明菌株 FLP36 降解有机磷的能力最强。

解磷细菌活化有机磷的机理一般认为是酶解作用,即细菌感受到低磷胁迫,在其代谢过程中就会向胞外分泌酸性或碱性磷酸酶以及植酸酶等物质,将含磷有机化合物矿化,释放出有效磷<sup>[3]</sup>。磷酸酶参与的有机磷矿化主要依赖于磷酸酶自身的活性和有机磷的底物有效性<sup>[23]</sup>,而磷酸酶活性又与介质 pH 密切相关<sup>[15]</sup>。本研究发现不同菌株对应的培养液中 pH 的变化幅度存在显著差异,且 pH 与磷酸酶活性之间也存在极显著的负相关关系,而且磷酸酶活性与速效磷含量之间呈极显著的正相关关系,这表明培养液 pH 的降低有利于磷酸酶活性的增加和有机磷底物的有效性,进而促进有机磷的矿化,提高速效磷含量。

土壤中解磷微生物种类丰富,数量繁多,目前报道的具有解磷作用的细菌种类有芽孢杆菌属、假单胞菌属、欧文氏菌属、沙雷氏菌属、微球菌属、黄杆菌属、固氮菌属、根瘤菌属、沙门氏菌属、产碱杆菌属、色杆菌属、硫杆菌属、节杆菌属等<sup>[24]</sup>。许多研究也已证明芽孢杆菌属的细菌溶解磷酸钙的能力较强<sup>[25-29]</sup>,而对于降解有机磷的解磷菌株来说,目前相关研究还相对较少,但也有研究表明芽孢杆菌属的细菌降解有机磷的能力也较强<sup>[30-32]</sup>。本研究通过分子鉴定发现菌株 FLP36 属于芽孢杆菌属,而且降解植酸钙的能力最强,这也证明芽孢杆菌属的细菌既能溶解难溶性无机磷,又能溶解有机磷,而且溶磷能力较强。

本研究从冬小麦田间筛选鉴定出 5 株不同的解磷菌株,通过溶磷圈法和液体培养法判断其解磷能力,发现降解植酸钙能力最强的是菌株

FLP36,隶属于芽孢杆菌属,但由于本研究并未将这些解磷菌株作为菌剂进行盆栽或田间试验,还不清楚它们实际的解磷和促生效果,因为在不同的培养条件下,普遍存在解磷效果不稳定的问题<sup>[33]</sup>。而解磷细菌作为植物促生菌的一种,已被证明其在促进植物生长、提高产量和磷养分吸收以及防治病虫害等<sup>[34-38]</sup>方面发挥着至关重要的作用,同时解磷细菌也是微生物肥料的重要组分,因此,筛选高效的解磷菌株不仅丰富了菌种资源库,为微生物肥料的研制提供了充足的菌株,而且也降低了作物对化学肥料的依赖,为实现农业绿色发展提供了新的思路和理论支撑。

### 参考文献 Reference:

- [1] SINGH B K, CAMPBELL C D, SORENSON S J, *et al.* Soil genomics[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(10): 756.
- [2] NANNIPIERI P, ASCHER J, CECCHERINI M T, *et al.* Microbial diversity and soil functions[J]. *European Journal of Soil Science*, 2017, 68(1): 12-26.
- [3] RICHARDSON A E, SIMPSON R J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 989-996.
- [4] CHEN Y P, REKHA P D, ARUN A B, *et al.* Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(1): 33-41.
- [5] JORQUERA M A, HERNÁNDEZ M T, RENGEL Z, *et al.* Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2008, 44(8): 1025-1034.
- [6] 冯哲叶. 溶磷细菌的筛选及其对大豆促生效果的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2017.  
FENG ZH Y. Screening of phosphate-solubilizing bacteria and effect of promoting soybean growth[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.
- [7] 唐岷宸, 李文静, 宋天顺, 等. 一株高效解磷菌的筛选及其解磷效果验证[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(6): 102-109.  
TANG M CH, LI W J, SONG T SH, *et al.* Screening of a highly efficient phosphate-solubilizing bacterium and validation of its phosphate-solubilizing effect[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(6): 102-109.
- [8] RFAKI A, ZENNOUHI O, ALIYAT F Z, *et al.* Isolation, selection and characterization of root-associated rock phosphate solubilizing bacteria in Moroccan wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. *Geomicrobiology Journal*, 2020, 37(3): 230-241.
- [9] MAGALLON-SERVÍN P, ANTOUN H, TAKTEK S, *et al.* The maize mycorrhizosphere as a source for isolation

- of arbuscular mycorrhizae-compatible phosphate rock-solubilizing bacteria[J]. *Plant and Soil*, 2020, 451(1/2): 169-186.
- [10] MATTER J M, SAMPAIOS C, ROSAD M, *et al.* Isolation of phosphate-solubilizing bacteria from subtropical soils with different fertilization histories[J]. *Bioscience Journal*, 2020, 36(4): 1083-1089.
- [11] WAN W J, QIN Y, WU H Q, *et al.* Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria with multiple phosphorus sources utilizing capability and their potential for lead immobilization in soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 752.
- [12] 宋小双, 遇文婧, 周琦, 等. 樟子松根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(32): 76-81.
- SONG X SH, YU W J, ZHOU Q, *et al.* Isolation, identification and phosphate solubilization analysis of phosphate-solubilizing bacteria derived from *Pinus sylvestris* var. *mongolica* rhizosphere soil[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(32): 76-81.
- [13] 吕俊, 潘洪祥, 于存. 马尾松根际溶磷细菌 *Paraburkholderia* sp. 的筛选、鉴定及溶磷特性研究[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 147-156.
- LÜ J, PAN H X, YU C. Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of phosphate-solubilizing *Paraburkholderia* sp. from *Pinus massoniana* rhizosphere soil[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 147-156.
- [14] TURNER B L, PAPHAZY M J, HAYGARTH P M, *et al.* Inositol phosphates in the environment[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series Biological Sciences*, 2002, 357(1420): 449-469.
- [15] TURNER B L, HAYGARTH P M. Phosphatase activity in temperate pasture soils: potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity[J]. *Science of the Total Environment*, 2005, 344(1/3): 27-36.
- [16] NAUTIYAL C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(1): 265-270.
- [17] PONMURUGAN P, GOPI C. Distribution pattern and screening of phosphate solubilizing bacteria isolated from different food and forage crops[J]. *Journal of Agronomy*, 2006, 5(4): 600-604.
- [18] EDI-PREMONO M, MOAWAD A M, VLEK P L G. Effect of phosphate-solubilizing *Pseudomonas putida* on the growth of maize and its survival in the rhizosphere[J]. *Indonesian Journal of Crop Science*, 1996, 11(1): 13-23.
- [19] MURPHY J, RILEY J P. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1962, 27: 31-36.
- [20] JONER E J, JOHANSEN A. Phosphatase activity of external hyphae of two arbuscular mycorrhizal fungi[J]. *Mycological Research*, 2000, 104(1): 81-86.
- [21] SUDHIR K, GLEN S, KOICHIRO T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [22] TAMURA K, NEI M, KUMAR S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [23] GEORGE T S, GREGORY P J, HOCKING P, *et al.* Variation in root-associated phosphatase activities in wheat contributes to the utilization of organic P substrates in vitro, but does not explain differences in the P-nutrition of plants when grown in soils[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 64(3): 239-249.
- [24] SHARMA S B, SAYYED R Z, TRIVEDI M H, *et al.* Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. *Springer Plus*, 2013, 2: 587.
- [25] WANG Z, XU G Y, MAP D, *et al.* Isolation and characterization of a phosphorus-solubilizing bacterium from rhizosphere soils and its colonization of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1270.
- [26] 郑喜清, 邸娜, 李旭红, 等. 土壤中解磷细菌的分离筛选[J]. *北方园艺*, 2017(9): 164-168.
- ZHENG X Q, DI N, LI X H, *et al.* Isolation and screening of phosphorus solubilizing bacterial strains in soil[J]. *Northern Horticulture*, 2017(9): 164-168.
- [27] 陈炫, 林希昊. 甘蔗根际土壤解磷细菌的筛选及培养条件优化[J]. *热带农业科学*, 2017, 37(12): 61-69.
- CHEN X, LIN X H. Screening of phosphorus-solubilizing bacteria in sugarcane rhizosphere soil and the optimization of culture conditions[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2017, 37(12): 61-69.
- [28] 刘小玉, 付登强, 贾效成, 等. 油茶根际土壤解磷菌的筛选、鉴定及培养条件[J]. *西南农业学报*, 2016, 29(11): 2637-2642.
- LIU X Y, FU D Q, JIA X CH, *et al.* Isolation, identification and culture condition of phosphate-solubilizing bacteria derived from camellia rhizosphere soil[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 29(11): 2637-2642.
- [29] 张海燕, 唐梦园, 白美玉, 等. 小麦根际解磷细菌的筛选鉴定及培养条件的研究[J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(4): 425-432.
- ZHANG H Y, TANG M Y, BAI M Y, *et al.* Study on screening, identification and culture conditions of phosphorus-solubilizing bacteria in wheat rhizosphere[J]. *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2020, 50(4): 425-432.

- [30] 王欢,王敬敬,徐松,等.有机磷降解菌的筛选及其促生特性[J].微生物学报,2017,57(5):667-680.  
WANG H,WANG J J,XU S,*et al.* Screening and growth promoting characteristics of efficient organophosphate-degradation bacteria [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017,57(5):667-680.
- [31] 柴小粉,张林,田芷源,等.玉米丛枝菌根真菌根外菌丝表面定殖细菌解磷功能鉴定[J].植物营养与肥料学报,2016,22(4):1031-1038.  
CHAI X F,ZHANG L,TIAN ZH Y,*et al.* Identification of phytate mineralizing bacteria colonized on the extraradical hyphal surface of arbuscular mycorrhizal fungi in a maize field[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizer*, 2016,22(4):1031-1038.
- [32] 伍善东,刘清术,付祖姣,等.解有机磷拮抗细菌的筛选及其解磷特性和拮抗作用[J].江苏农业学报,2017,33(4):843-847.  
WU SH D,LIU Q SH,FU Z J,*et al.* Screening of the bacteria-degrading organic phosphate and their degradative characteristics and antagonism [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2017,33(4):843-847.
- [33] 邢芳芳,高明夫,嵇优优,等.玉米根际高效溶磷菌的筛选、鉴定及溶磷特性研究[J].中国农学通报,2016,32(9):119-124.  
XING F F,GAO M F,ZHUO Y Y,*et al.* Screening and identification of phosphate solubilizing bacteria in maize rhizosphere and their characteristics of phosphate solubilizing [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2016,32(9):119-124.
- [34] 王亚艺,蔡晓剑,李松龄,等.解磷细菌的应用效果[J].西北农业学报,2014,23(7):197-200.  
WANG Y Y,CAI X J,LI S L,*et al.* Study on application effects of P-solubilizing bacteria [J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2014,23(7):197-200.
- [35] 程宝森,房玉林,刘延琳,等.渭北旱塬葡萄根际解磷细菌的筛选及其对葡萄的促生效应[J].西北农业学报,2009,18(4):185-190.  
CHENG B S,FANG Y L,LIU Y L,*et al.* Screening and promotion effect of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizosphere in weibei semi-arid plateau[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2009,18(4):185-190.
- [36] 张艺灿,刘凤之,王海波.根际溶磷微生物促生机制研究进展[J].中国土壤与肥料,2020(2):1-9.  
ZHANG Y C,LIU F ZH,WANG H B. Research progress on plant-growth-promoting mechanisms of phosphate-solubilizing rhizosphere microbes[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(2):1-9.
- [37] BARRA P J,VISCARDI S,JORQUERA M A,*et al.* Understanding the strategies to overcome phosphorus-deficiency and aluminum-toxicity by ryegrass endophytic and rhizosphere phosphobacteria[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018,9:1155.
- [38] KOUR D,RANA KL,KAUR T,*et al.* Biodiversity, current developments and potential biotechnological applications of phosphorus-solubilizing and-mobilizing microbes:a review[J]. *Pedosphere*, 2021,31(1):43-75.

## Isolation and Phosphate Solubilizing Capability of Phosphate-Solubilizing Bacteria in a Wheat Field

SUN Yaqin<sup>1</sup>, YE Shengjia<sup>1</sup>, FAN Guo'an<sup>1,2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>,  
LIU Xing<sup>1</sup>, WU Dafu<sup>1</sup> and WANG Fei<sup>1</sup>

(1. School of Resources and Environment, Henan Institute of Science and Technology, Xinxing Henan 453003, China;

2. College of Grassland and Environment Sciences, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

**Abstract** In the present study, phytin, a kind of organic P, was chosen as sole P source in the medium to isolate phosphate-solubilizing bacteria in the soil collected from a wheat field. Identification of phosphate-solubilizing bacteria and construction of phylogenetic tree was subjected to 16S rRNA gene sequencing technology. The phosphatase activity of the isolated phosphate-solubilizing bacterial strains was determined according to the actual pH of the culture medium. The phosphate-solubilizing ability was measured by the combination of the solubilization halo method and molybdenum blue method. Five phosphate-solubilizing bacterial strains were identified and affiliated to the genus of *Bacillus*, *Arthrobacter* and *Pseudarthrobacter*, respectively. Compared with the initial pH, the pH of the culture medium corresponding to the five phosphate-solubilizing strains was significantly decreased and the actual phosphatase activity ranged from 5.18 to 6.39  $\mu\text{g}/(\text{mL} \cdot \text{min})$ . The concentration of soluble P mobilized from phytin ranged from 2.49 to 3.55 mg/L and the mobilization ratio ranged from 19.28% to 43.54%. The phosphatase activity in the corresponding liquid medium was significantly and negatively correlated with pH, while was significantly and positively correlated with soluble P concentration. The strain with most powerful capability to mobilize phytin belonged to *Bacillus*. These results provide a theoretical basis for studying on the mobilization of soil organic P by phosphate-solubilizing bacteria and useful reference for development and application of microbial fertilizers.

**Key words** Phosphate-solubilizing bacteria; Phosphate-solubilization halo; Organic P; Phosphatase activity; Phosphate solubilizing capability

**Received** 2021-04-12

**Returned** 2021-08-09

**Foundation item** The National Natural Science Foundation of China (No. 31872184); Innovation Training Program for Students in Henan Institute of Science and Technology (No. 2021CX45); High-level Talents Research Project of Henan Institute of Science and Technology (No. 2016031).

**First author** SUN Yaqin, male, master student. Research area: interaction between plants and phosphate-solubilizing bacteria. E-mail: yaqinsun0622@stu.hist.edu.cn

**Corresponding author** WANG Fei, female, Ph. D, associate professor. Research area: enhancement of organic P mobilization by microbial interactions in the rhizosphere or hyphosphere. E-mail: wangfei@hist.edu.cn

(责任编辑: 史亚歌 Responsible editor: SHI Yage)