

马晓丽,张婷婷,郭 欢,等. 红花根际磷细菌筛选、鉴定及其促生效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):318-322.

红花根际磷细菌筛选、鉴定及其促生效果

马晓丽,张婷婷,郭 欢,龙丽红,蒋 静,张 霞

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

摘要:通过选择培养基,从红花根际土中分离出 8 株溶磷效果好的解磷细菌。钼锑抗比色法测量其溶磷能力,通过形态学、生理生化表型测定,结合 16S rDNA 基因序列同源性分析鉴定,并对获得的溶磷效果较好的菌株进行盆栽试验。试验结果表明:8 株菌分为以下几个属,CM1 和 CM6 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),CM4、CM7、CM8 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),CM2、CM3、CM5 分别属于根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)。CM5、CM6 两株菌对红花生长有明显的促进作用。

关键词:红花;溶磷细菌;筛选和鉴定;促生

中图分类号: S154.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0318-05

磷是植物生长发育所必需的营养元素^[1],缺磷可导致农作物产量明显降低。土壤全磷含量虽然较高,但易与土壤中的金属离子相结合形成难溶的磷化物,只有少量磷肥可以被植物吸收利用。当季的作物对施入磷肥的利用率仅为 25%,因此,磷被认为是限制性营养元素^[2]。红花生长发育受化学肥料尤其是磷酸盐肥料影响较大,但使用这些化学肥料会增加土壤及水污染,过量使用磷肥会造成水体富营养化^[3],同

时会积累一些重金属,威胁人类的健康。另一方面,长期使用化学肥料会导致土壤结构退化^[4]。如今,基于化学肥料价格及对农业系统可持续发展的考虑,人们对生物肥料的关注越来越高。

一些细菌可以提供植物生长所需的磷,同时扮演了溶磷微生物的角色。土壤中存在大量有溶磷能力的微生物,称为溶磷微生物^[5]。溶磷微生物能将难以被植物吸收的磷元素转化为易于吸收利用的状态,提高磷元素的利用率,从而提高作物产量,也减少了磷肥的过度使用。利用溶磷微生物将难溶性磷酸盐转变为可溶性磷是非常有必要的。溶磷微生物提高有效磷含量的同时,还可改善施用化学磷肥所带来的环境污染。因此研究根际磷细菌,对发展溶磷微生物肥料具有重要的现实意义。目前已有的溶磷微生物种类很多,有细菌、真菌、放线菌等,溶磷能力差异较大^[6]。所以,从根际土中筛选

收稿日期:2013-11-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160410);石河子大学优秀青年项目(编号:2012ZRKXYQ13)。

作者简介:马晓丽(1989—),女,硕士研究生,研究方向为土壤微生物。E-mail:1836615688mx@sina.cn。

通信作者:张 霞,教授,硕士生导师,从事植物遗传研究。E-mail:xiash@shzu.edu.cn。

表 3 正交试验各因素统计分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	0.076	22	0.003	4.570	0.045
截距	18.223	1	18.223	24 218.034	0.000
A	0.009	2	0.004	5.932	0.064
B	0.024	2	0.012	15.898	0.012
C	0.003	2	0.002	2.068	0.242
D	0.004	2	0.002	2.847	0.170
E	0.003	2	0.002	2.271	0.219
A × B	0.015	4	0.004	4.847	0.078
A × C	0.008	4	0.002	2.814	0.170
A × E	0.009	4	0.002	2.966	0.159
误差	0.003	4	0.001		
合计	18.302	27			
校正误差	0.079	26			

注: $R^2=0.962$,调整 $R^2=0.751$ 。

始 pH 值为 4,C/N 比为 8:1。

3 小结

本试验以高产纤维素酶的 1 株丝状产油真菌为材料,利用农业玉米秸秆纤维素为主要碳源,通过单因素及正交试验

方法优化产油发酵工艺,发现最优产油发酵工艺为:碳源为 2% 纤维素+2% 葡萄糖,氮源为硝酸铵,温度为 28℃,培养时间为 5 d,初始 pH 值为 4,C/N 比为 8:1,这为进一步开发和利用农业秸秆、生产微生物油脂提供了参考,具有一定的理论研究和实际应用价值。

参考文献:

- [1] 张传富,顾文杰,彭科峰,等. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. 生物信息学,2007,5(1):34-36.
- [2] Perlack R D, Wright L L, Turhollow A F, et al. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion ton annual supply [D]. USDA: Oak Ridge National Laboratory, 2005.
- [3] 张玲秀,温雪梅,郑小妹,等. 降解玉米秸秆纤维素真菌的筛选及产油特性的研究[J]. 安徽农学通报,2012,18(17):47-49.
- [4] 刘吉华,袁 生,戴传超. 一种新的丝状真菌油脂含量快速鉴定方法[J]. 生物技术,1998,8(1):43-44,40.
- [5] Gill C O, Hall M J, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977,33(2): 231-239.

出溶磷能力好的溶磷微生物,制成生物肥料来提高磷素利用率成为研究热点。

本研究从红花根际土中筛选出 8 株溶磷细菌,并对 8 株溶磷细菌进行了鉴定,同时在温室条件下,选取 3 株溶磷效果较好并且具有良好溶磷稳定性的解磷菌接种红花,研究了 3 株解磷菌对红花盛花期生长的影响。该研究以期对红花生物肥料菌种资源与应用提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:红花(*Carthamus tinctorius* L.)种子,品种“新红 4 号”,产地新疆石河子。

供试培养基:蒙金娜无机培养基:葡萄糖 10 g,琼脂 20 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g, MgSO₄ · 4H₂O 0.03 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, 磷矿粉 10 g, 酵母膏 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0 ~ 7.5; 蒙金娜无机液体培养基:配方同蒙金娜无机培养基,不加琼脂。

蒙金娜有机培养基:葡萄糖 10g, 琼脂 20g, (NH₄)₂SO₄

0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03g, MgSO₄ · 4H₂O 0.03 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, 卵磷脂 0.2 g, 碳酸钙 5 g, 酵母膏 0.4 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0 ~ 7.5; 蒙金娜有机液体培养基:配方同蒙金娜有机培养基,不加琼脂。

溶磷细菌纯培养保藏培养基(NA):牛肉膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 20 g, 水 1 000 mL, pH 值 7.0 ~ 7.2; 溶磷细菌培养培养基(NB):配方同 NA, 不添加琼脂。

1.2 方法

1.2.1 红花室内培育 选取粒大、饱满、色白的红花种子,在 40 ℃温水中浸泡 10 min,转入冷水中冷却,取出晾干后播种。每盆播 20 粒红花种子,室温 15 ~ 20 ℃下培养至发芽。

1.2.2 红花大田定植 移栽红花幼苗之前,对移栽地进行精耕细耙,以减少样地空间异质性。待红花幼苗生长 30 d 后,选择生长状况相对一致的幼苗移栽至试验大田中。大田设在石河子大学节水灌溉试验站(兵团灌溉试验站石河子大学分站)(北纬 40°16′58.4″ ~ 46°43′31.8″,东经 82°30′32″ ~ 89°01′02″)。此区域属典型大陆性干旱半干旱气候,样地具体情况见表 1。

表 1 研究区土壤环境因子

地区	含水量 (%)	pH 值	电导率 (μS/cm)	有机质 (g/kg)	速效氮 (mg/kg)	速效磷 (mg/kg)	速效钾 (mg/kg)
石大实验站	9.05 ± 2.03	8.52 ± 0.13	502.31 ± 43.30	27.98 ± 2.09	0.151 5 ± 0.086 1	0.112 ± 0.046 1	44.40 ± 5.01

1.2.3 土壤样品的采集 红花伸长期从样地里挖出整株红花,抖掉根周围松散的土壤,刷下附着在红花根上的土壤,装入封口袋密封后带回实验室,过 1 mm 筛后,放入 4 ℃冰箱保存备用。

1.2.4 红花根际溶磷细菌分离纯化及筛选 称取 5 g 保存的土壤样品,加入 45 mL 无菌水与 10 粒灭菌玻璃珠,常温 200 r/min 振荡 25 min,按 10 倍稀释法稀释样品。采用 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释浓度,使用蒙金娜固体培养基培养。30 ℃恒温培养 5 d。测量解磷圈直径(D)、菌落直径(d),根据 D/d 大小来初步确定菌株的解磷能力。挑取单菌落至 NA 培养基培养 2 ~ 3 d,置于 4 ℃冰箱保存。解磷细菌的复筛采用钼锑抗比色法^[7]。通过初筛,选择 8 株溶磷圈较大的菌株,分别接种于 30 mL NB 培养基中,120 r/min、28 ℃培养 36 h,并用无菌水制成 10⁸ CFU/mL 悬浮菌液。每瓶接种 1 mL 细菌菌液于灭菌的蒙金娜液体摇瓶培养基中,重复 3 次。以接种等量灭活细菌液作对照,摇床培养(28 ℃,160 r/min)5 d。钼锑抗比色法测定上清液有效磷含量及测定上清液 pH 值。

1.2.5 溶磷细菌的鉴定

1.2.5.1 理化性质及形态学分类 按照文献[8]作形态与生理生化分析。

1.2.5.2 16S rDNA 鉴定 使用细菌 16S rDNA 的通用引物 8F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′)和 1492R(5′-CG-GTTACCTTGTACGACTT-3′)进行扩增。PCR 扩增经琼脂糖凝胶电泳检测产物后,送至北京三博远志测序部测序。将得到的序列提交到 GenBank 数据库,利用 BLAST 与 GenBank 数据库中的序列进行比对,用 ClustalX1.81 软件将相近序列进行多重序列分析,利用 MEGA V.4.0 软件构建系统发育树(Bootstrap = 1 000)。

1.2.6 溶磷细菌的温室试验 将 3 株溶磷效果好的溶磷菌活化,接种于液体培养基中,28 ℃、200 r/min 振荡培养 2 d 后,发酵液离心(4 ℃,4 000 r) 5 min,无菌生理盐水洗菌体 3 次,用无菌生理盐水制成 10⁸ CFU/mL 悬浮菌液,接种红花幼苗(苗龄 20 d),每株接种量 8 mL,以接种生理盐水作对照,每个处理 3 个重复,温室培养,培养基质为土壤:蛭石:沙子 = 3:1:1 的混合基质,每盆 4 kg,土壤有机质为 9.8 g/kg,速效磷为 6.5 mg/kg,速效钾为 155 mg/kg,碱解氮为 35.9 mg/kg。红花接种 90 d 后测株高、茎粗、叶片数、根长、茎干质量。

2 结果与分析

2.1 红花根际磷细菌的分离与筛选

用选择培养基平板从红花根际土中分离出 10 株能产生溶磷圈的细菌。利用解磷圈直径(D)、菌落生长直径(d)的比值作为解磷菌相对解磷能力的指标,10 个菌株 D/d 值在 1.87 ~ 4.03, D/d > 4 的有 1 株, 2 < D/d < 4 的有 7 株; 1.8 < D/d < 2 的有 2 株(表 2)。只有 CM1、CM5、CM6 3 株溶磷菌经过 10 次传代划线培养后,仍然有溶磷圈,说明具有良好的溶磷稳定性^[9]。

2.2 溶磷细菌溶磷能力测定

测定结果见表 3。不同菌株的溶磷量在 181.34 ~ 283.14 mg/L 之间,显著高于对照(P < 0.05),说明 8 株菌株都有较强的溶磷能力。其中 CM6 的总解磷量为 283.14 mg/L,显著高于其他菌株,解磷效果最强。CM4 的总解磷量最低,为 181.34 mg/L。

2.3 溶磷细菌的鉴定

2.3.1 溶磷细菌的形态学特征 对 8 株溶磷细菌的形态及菌落特征观察,可以得到,菌株 CM4、CM7、CM8 为芽孢革兰

表 2 解磷细菌培养 6 d 的 *D/d* 值

菌株编号	菌落直径 <i>d</i> (mm)	解磷圈直径 <i>D</i> (mm)	比值	排序 <i>D/d</i>
CM6	3.6	14.5	4.03	1
CM5	2.3	7.9	3.43	2
CM1	5.1	15.8	3.10	3
CM3	3.1	8.7	2.81	4
CM7	6.1	14.8	2.42	5
CM8	4.2	9.8	2.33	6
CM2	7.1	15.7	2.21	7
CM4	5.9	12.6	2.14	8
CM9	9.2	17.9	1.94	9
CM10	8.7	16.3	1.87	10

氏阳性短杆菌,菌落半透明,圆形,表面干燥,周生鞭毛;菌株 CM1、CM2、CM5、CM6 为无芽孢革兰氏阴性短杆菌,菌落圆

表 3 8 株解磷菌株解磷量及其 pH 值

菌株编号	pH 值	P(mg/L)
CM1	5.23f	237.98dc
CM2	5.41de	195.52cd
CM3	5.65c	192.47cd
CM4	5.87b	181.34be
CM5	5.14f	259.29eb
CM6	4.93g	283.14fa
CM7	5.31e	195.61cd
CM8	5.56cd	192.89cd
CK	6.90a	21.16af

注:同列中不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

形,表面光滑,湿润,边缘整齐,除 CM5 无鞭毛外,CM1、CM2、CM6 均有极生鞭毛;CM3 为革兰氏阳性菌,菌落灰白色,不规则形,干燥,不透明,不易挑取,结果见表 4。

表 4 菌株形态特征

菌株编号	菌落特征
CM1	0.7~0.8 μm×2.3~2.8 μm,短杆状,能运动,有极生丛毛,白色,圆形,光滑,不透明
CM2	0.5~0.9 μm×1.2~3.0 μm,杆状,圆形,半透明,黏稠,凸起
CM3	0.5~2.0 μm 灰白色,不规则形,干燥,不透明,不易挑取
CM4	0.3~2.2 μm×1.2~7.0 μm,椭圆状,产芽孢,扁平,不透明,边缘不整齐,表面粗糙
CM5	1.0~1.5 μm×1.5~2.5 μm,球杆状,无芽孢,无鞭毛,无色,圆形,光滑,边缘整齐
CM6	0.5~0.8 μm×1.5~3.0 μm,短杆状,有极生单鞭毛,不产芽孢,圆形,光滑,不透明
CM7	0.3~2.2 μm×1.2~7.0 μm,柱状,产中生孢子,白色,镶边,半透明,湿润,稍隆起
CM8	0.3~2.2 μm×1.2~7.0 μm,直杆状,乳白色,镶边,不透明

2.3.2 溶磷细菌的生理生化特性 对 8 株溶磷细菌的生理生化鉴定有氧化酶、接触酶、淀粉水解、吡啶试验、甲基红测试等,结果见表 5。8 菌株在接触媒试验中均表现为阳性,而在氧化酶反应、淀粉酶试验及吡啶试验中,阴性与阳性各占 50%,甲基红试验中,阳性为 12.5%。其中,CM1、CM6 淀粉

水解及甲基红反应为阴性,其余均为阳性;CM4、CM7、CM8 甲基红反应、氧化酶反应为阴性,其余均为阳性;CM2 淀粉水解、甲基红反应及吡啶反应为阴性,其余均为阳性;CM3 全为阳性、CM5 接触酶反应及需氧反应为阳性,其余均为阴性。

2.3.3 16S rDNA 鉴定 分别以 8 个菌株 DNA 为模板,采用

表 5 8 株溶磷细菌生理生化特性

试验名称	CM1	CM2	CM3	CM4	CM5	CM6	CM7	CM8
需氧反应	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶试验	+	+	+	-	-	+	-	-
过氧化氢酶试验	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉酶试验	-	-	+	+	-	-	+	+
甲基红试验	-	-	+	-	-	-	-	-
吡啶试验	+	-	+	+	-	+	-	-

注:“-”为阴性反应;“+”为阳性反应。

通用引物扩增出长约 1 500 bp 的片段,琼脂糖凝胶电泳检测后进行测序。将 8 菌株 16S rDNA 基因序列提交到 GenBank 数据库,其登录号分别为 KC844218、KC844219、KC844220、KC844221、KC844222、KC844223、KC844224、KC844225,通过 Blast 工具在 GenBank 数据库中与已发表的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对,与相近序列联配比较构建系统发育树。由系统发育树(图 1)可知,8 菌株隶属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*),分别与已知种荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、苜蓿中华根瘤菌(*Sinorhi-*

zobium meliloti)、乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*)、铜绿色假单胞菌(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)系统发育关系接近,序列同源性分别达到 99%。再结合细菌的培养特征、生理生化测定结果和系统发育分析结果,初步确定 8 菌株中:CM1 和 CM6 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),CM4、CM7、CM8 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),CM2、CM3、CM5 分别属于根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)。菌株 CM1、CM2、CM3、CM4、CM5、CM6、CM7、CM8 分别鉴定为 *Pseudomonas* sp.、*Sinorhizobium meliloti*、*Streptomyces*、*Bacillus licheniformis*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Pseudomonas fluorescens*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus mojavensis*。

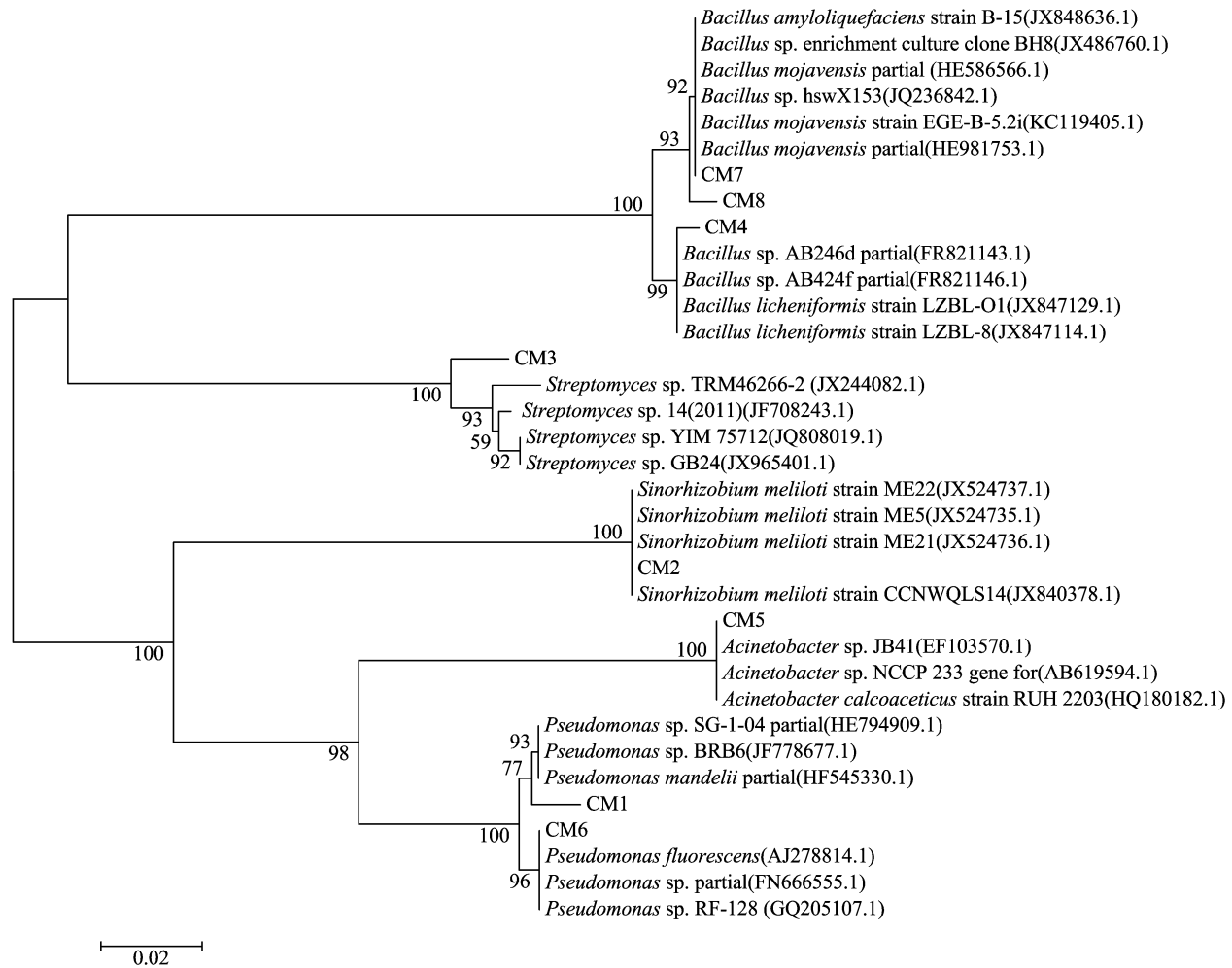


图1 8株溶磷菌株的系统发育树

2.4 解磷菌菌株对红花的促生长作用

在温室条件下,将红花分别接种 CM1、CM5、CM6,90 d 后测株高、茎粗、叶片数、根长、茎干质量。结果如表 6 所示,接种 3 株溶磷菌后,红花的株高、茎粗、叶片数、根长、茎干质量,菌处理的各项指标均超过未处理的对照,除 CM1 外,接种 CM5、CM6 各项指标显著提高 ($P < 0.05$),说明除 CM1 外,其余两株溶磷细菌对红花生长具有促进作用。

表 6 3 株溶磷细菌对红花生长的影响

菌株	株高 (cm)	茎粗 (cm)	叶片数 (张)	根长 (cm)	茎干质量 (g)
CM1	102.40ab	0.92ab	111.67a	15.49a	33.38ab
CM5	107.73b	1.08bc	80.32b	18.52b	36.19bc
CM6	112.43b	1.28c	122.33b	21.48c	43.50c
CK	90.43a	0.74a	74.64a	14.37a	26.12a

3 讨论

从红花根际土壤中分离出 8 株具有较好解磷效果的溶磷细菌,分别为 CM1、CM2、CM3、CM4、CM5、CM6、CM7、CM8。经生理生化及 16S rDNA 鉴定后,分为以下几个属:假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、不动杆菌属 (*Acineto-*

bacter),菌株 CM1、CM2、CM3、CM4、CM5、CM6、CM7、CM8 分别鉴定为 *Pseudomonas* sp.、*Sinorhizobium meliloti*、*Streptomyces*、*Bacillus licheniformis*、*Acinetobacter calcoaceticus*、*Pseudomonas fluorescens*、*Bacillus amyloliquefaciens*、*Bacillus mojavensis*。

接种 3 株具有稳定遗传能力的溶磷细菌 CM1、CM5、CM6 后,CM5、CM6 菌株显著增加了红花植株株高、茎粗、叶片数、根长、茎干重,说明这 2 株溶磷细菌能够促进红花对营养物质的吸收。这 3 株菌被定义为促进植物生长的根际细菌^[10],能够促进植物生长,有效阻止病原菌侵染植物。有研究结果表明,接种溶磷微生物后,成功地减少了植物染病的概率^[11-12]。

多数研究者认为,微生物的解磷作用,主要取决于其分泌有机酸的能力以及它们的螯合能力^[13]。Fankem 等发现解磷微生物解磷能力随着土壤 pH 值降低而升高,与分泌的有机酸产物相关^[14]。Hinsinger 发现根部释放的有机配体也能够改变土壤中有效磷的浓度^[15]。相关研究发现荧光假单胞菌分泌葡萄糖酸和草酸;芽孢杆菌属分泌柠檬酸和葡萄糖酸,解淀粉芽孢杆菌及地衣芽孢杆菌分别分泌乳酸和异戊酸^[16]。本试验中,pH 值与对照相比较有所降低,说明 8 株菌产生相应的酸,但解磷能力与分泌有机酸这两者之间是否有必然的联系,需要进一步研究。

解磷微生物优势之一是其繁殖速率,能够满足植物根际

对磷的需求。印度农业研究所研究溶磷菌对小麦和水稻产量及磷吸收影响的研究结果表明:接种溶磷菌使其产量及对磷的吸收均有所增加^[17]。Ratti 等研究表明,柠檬草接种溶磷微生物后,与对照相比,其高度及生物量都显著升高^[18]。Hazarika 等指出,使用溶磷微生物肥料显著增加了茶树植株高度^[19]。Mustafa 等研究发现,接种磷细菌对其他植物也存在促进效果^[20]。Belimov 等的研究表明,土壤接种混合微生物后,植物根部对磷素及氮素的吸收明显升高^[21]。生物肥料的施用对农业生产及保护环境具有重大意义。本试验以红花根际土为研究对象,从红花根际土中分离、筛选及鉴定出 8 株溶磷能力好的解磷细菌。选取 3 株溶磷效果较好并且具有稳定遗传能力的溶磷细菌接种红花,其中两株菌能够促进红花生长。本研究为红花生物肥料菌种资源提供一定的理论基础,对红花微生物肥料研究具有一定意义。后期将会重点研究红花菌根真菌接种后对红花根际磷细菌的影响,以期了解菌根真菌、解磷细菌及植物营养三者之间的关系,为微生物肥料的研究提供理论依据。

参考文献:

- [1] 贝盏临,张欣. 灵武长枣根际溶磷菌的分离研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(4):311-313.
- [2] Abou - Aly H, Mady M A, Moussa S. Interaction effect between phosphate dissolving microorganisms and Boron on growth, endogenous phytohormones and yield of squash (*Cucurbita pepo* L.) [C]. The first scientific conference of the agriculture chemistry and environment society, Cairo, Egypt. 2006.
- [3] 聂素梅,徐晓锋,苗艳芳. 蔬菜地磷淋失调控途径的研究[J]. 江苏农业科学,2011(1):179-180.
- [4] Singh Y P, Dwivedi R, Dwivedi S V. Effect of bio - fertilizers and graded dose of nitrogen on growth and flower yield of calendula (*Calendula officinalis*) [J]. Plant Arch, 2008, 8(2):957-958.
- [5] Ehteshami S R, Aghaalkhani M, Khavazi K, et al. Effect of phosphate solubilizing microorganisms on quantitative and qualitative characteristics of maize (*Zea mays* L.) under water deficit stress [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2007, 10(20):3585-3591.
- [6] Bojinova D, Velkova R, Ivanova R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger* [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(15):7348-7353.
- [7] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京:中国农业出版社,2000:74-76.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [9] 叶劲松,吴克,俞志敏. 1 株无机磷细菌筛选及溶磷能力的测定[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):333-335.
- [10] Kloepper J W, Schroth M N. Plant growth - promoting rhizobacteria on radishes [C]//Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria Vol II. Tours: Gilbert - Clary, 1978: 879-882.
- [11] Zayed G, Abdel - Motaal H. Bio - active composts from rice straw enriched with rock phosphate and their effect on the phosphorous nutrition and microbial community in rhizosphere of cowpea [J]. Biores Technol, 2005, 96:929-935.
- [12] Peix A, Rivas - Boyero A A, Mateos P F, et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33:103-110.
- [13] Delvasto P, Valverde A, Ballester A, et al. Characterization of brushite as a re - crystallization product formed during bacterial solubilization of hydroxyapatite in batch cultures [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2006, 38(9):2645-2654.
- [14] Fankem H, Nwaga D, Deubel A, et al. Occurrence and functioning of phosphate solubilizing microorganisms from oil palm tree (*Elaeis guineensis*) rhizosphere in Cameroon [J]. African J Biotech, 2006, 5:2450-2460.
- [15] Hinsinger P. Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root - induced chemical changes: a review [J]. Plant and Soil, 2001, 237:173-195.
- [16] Sharma A K. Bio - fertilizers for sustainable agriculture [J]. Agrobios Indian Pub, 2002:407.
- [17] Sharma S N, Prasad R. Yield and P uptake by rice and wheat grown in a sequence as influenced by phosphate fertilization with diammonium phosphate and Mussoorie rock phosphate with or without crop residues and phosphate solubilizing bacteria [J]. Journal of Agricultural Science, 2003, 141(3/4):359-369.
- [18] Ratti N, Kumar S, Verma H N, et al. Improvement in bioavailability of tricalcium phosphate to *Cymbopogon martinii* var. *motia* by rhizobacteria, AMF and *Azospirillum* inoculation [J]. Microbiol Res, 2001, 156:145-149.
- [19] Hazarika D K, Taluk D N, Phookan A K, et al. Influence of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi and phosphate solubilizing bacteria on nursery establishment and growth of tea seedlings in Assam [R]. Jorhat - Assam, India: Assam Agricultural University, 2000.
- [20] Mustafa Y, Bilenc S, Cakmakai R, et al. Effect of plant growth - promoting bacteria and soil compaction on barley seeding growth, nutrient uptake, soil properties and rhizosphere microflora [J]. Biol Fertile Soil, 2006, 42(4):350-357.
- [21] Belimov A A, Kojemiakov A P. Chuvarliyeva CV interaction between barley and mixed cultures of nitrogen fixing and phosphate - solubilizing bacteria [J]. Plant and Soil, 1995, 173:29-37.