

土壤中 1 株解磷细菌的筛选及其生长特性的研究

原海兵, 刘 军*, 韩志双, 郇阿梅, 石娇娇

(四川理工学院生物工程系, 自贡 643000)

摘 要: 从四川省自贡市施用磷肥较多的土壤中取样, 通过平板法和检测液体培养后的可溶性磷含量, 筛选出 1 株高效解磷细菌 L-P₁, 对菌株进行生理生化特征的鉴定和 16S rDNA 区段序列分析, 并对菌株的生长特性进行了研究。结果表明, 筛选到的解磷细菌 L-P₁ 是一株巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium* strain), 其分解磷矿粉的能力为 5.3 μg·mg⁻¹, 比对照组高 60.6%。它对糖源的利用能力为: 甘露醇>蔗糖>葡萄糖>淀粉>乳糖; 对碳源的利用能力为蔗糖>甘露醇 >葡萄糖>淀粉>乳糖; 对氮源的利用能力为牛肉膏>硫酸铵 >蛋白胨>硝酸钾>尿素。磷细菌的最适生长温度为 28~32℃, 最适 pH 生长范围为 7~8, 培养 28 h 菌体生物量达到最大。

关键词: 解磷细菌; 解磷能力; 16SrDNA; 生长特性

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0843-06

A phosphorus bacteria separated from soil and its growth characteristics

YUAN Hai-bing, LIU Jun, HAN Zhi-shuang, HUAN A-mei, SHI Jiao-jiao

(Department of Bioengineering, Sichuan University of Science and Engineering, Zigong 643000)

Abstract: A phosphorus bacteria named L-P₁ was separated in enriched phosphate soil from Zigong, Sichuan Province by plate method and detecting the available phosphorus in the culture, and then the strain was identified through biochemical characteristics and 16SrDNA sequence alignment. Its growth characteristics were also studied. The results showed that the bacterium is a *Bacillus megaterium* strain, and phosphate-dissolving ability was 5.3 μg·mg⁻¹, which was 60.6% higher than the control. And the ability to use sugar source was ranked as: Mannitol>sucrose>glucose>starch>lactose; the ability to use carbon source was ranked as: Sucrose>mannitol>glucose>starch>lactose; the ability to use nitrogen source was ranked as: Beef extract>ammonium sulfate>peptone>urea>potassium nitrate. The optimal condition for cultivation of L-P₁ strain was at 28-32℃ and pH 7-8. Under this condition, the biomass of L-P₁ could reach the maximum after culture for 28 h.

Key words: phosphorus bacteria; phosphate-dissolving ability; 16SrDNA; growth characteristics

磷是植物生长发育所必需的重要元素之一, 长期以来, 为了提高农作物的产量, 人们大量使用磷肥。肥料中的磷在施用后往往很快就被固定形成无效态磷^[1-2], 植物不能直接吸收, 导致对磷素的利用率很低, 严重影响了农作物的生长, 限制了农业生产的发展, 所以提高土壤中磷的利用率具有重要意义。解磷菌能将土壤中植物难以吸收利用的磷转化为植物可吸收利用的磷^[3]。因此, 筛选出高效解磷微生物, 生产含有较强解磷能力的微生物肥料, 可以很好地解决土壤磷素的利用问题, 已成为国内外目前非常

关注的研究课题。

作者从施用磷肥较多的红薯田选取土壤样品, 以解磷能力大小为指标, 筛选出一株细菌, 然后利用 16SrDNA 区段序列测序分析对分离到的菌株进行鉴定^[4-5], 为解磷微生物肥料的研究提供基础资料和条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 土壤取自于四川省自贡市富顺县李桥

收稿日期: 2013-04-25

基金项目: 四川省科技厅重点项目 (2013SZ0096) 和宜宾市科技局重点项目 (2012SF033) 共同资助。

作者简介: 原海兵, 男, 硕士研究生。E-mail: yuanhaibingncj@163.com

* 通信作者: 刘 军, 男, 教授。E-mail: scbnc@163.com

镇施用磷肥较多的红薯田,在田里不同点取 10 cm 左右深处的土壤,每个点取样约 500 g,无菌袋存放并编号,4℃冰箱保存,备用。

1.1.2 主要试剂 葡萄糖、蔗糖、甘露醇、硫酸亚铁、氯化钠、磷酸氢二钾、硫酸钙、硫酸铵、硝酸钾、硫酸钾、硫酸镁、氯化镁、氢氧化钠、碳酸钙、磷酸钙、乳糖、可溶性淀粉、琼脂粉、牛肉膏、蛋白胨、酵母粉、市售的解磷菌肥一种、PCR 扩增 50 μL 反应体系: 5 μL 10 \times buffer, 3 μL MgCl_2 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL *Taq* 酶(TaKaRa), 4 μL dNTPs (2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL Primer 1(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL Primer 2(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 1 μL 模版 DNA, 34 μL 灭菌双蒸水、琼脂糖凝胶。

1.1.3 主要仪器 SCW 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)、250HL 恒温恒湿培养箱(金坛市医疗仪器厂)、PHS-3C 酸度计(成都世纪方舟科技有限公司)、SHY-2102C 恒温培养振荡器(上海苏坤实业科技有限公司)、YXQ-LS-75S 立式灭菌锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、紫外可见分光光度计(北京普析通用公司)、PCR 扩增仪 PTC-200 (Bio-Rad, 美国)、微量紫外可见分光光度计 ND1000 (Gene, 美国)、凝胶成像系统 EQ (Bio-Rad, 美国)。

1.1.4 培养基 磷细菌选择性培养基: 葡萄糖 10.0 g, FeSO_4 0.03 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, NaCl 0.3 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, KCl 0.3 g, MnSO_4 0.03 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 8.0 g, 琼脂粉 15 g, H_2O 1 000 mL, pH 值 7.0。

磷细菌斜面培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉浸取物 3.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0。

磷细菌基础培养基: 蔗糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g, MgSO_4 0.3 g, NaCl 5 g, 琼脂 15.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0。

磷细菌液体培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉浸取物 3.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1.0 L, pH 7.0。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株初筛 称取 100 g 土壤,溶于 900 mL 无菌水中,混匀,用无菌水做梯度稀释,取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的稀释液,用移液枪吸取 100 μL 涂于磷细菌选择性培养基平板上,每个梯度做 3 个平行实验,倒置于恒温培养箱中 28~32℃ 下培养 5~7 d。根据解磷圈的大小作为菌株溶解难溶性磷能力的强弱,挑取溶磷圈大的单菌落传代纯培养 5 次,选择性能稳定的菌株作为初筛磷细菌目的菌。

1.2.2 菌株复筛 (1) 斜面菌株的制备: 称量磷细菌斜面培养基各种成分,溶解煮沸,然后分装试管,

于 121℃,灭菌 20 min,摆放斜面,待凝固后接种初筛菌株,并于恒温培养箱中 28~32℃ 下培养 1~2 d。

(2) 菌株解磷能力的测定: 在 250 mL 三角瓶中装入不含磷的基础液体培养液 100 mL,再添加磷矿粉 0.5 g,接种试管斜面保存的初筛菌株,30℃、130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 7 d,钼锑抗比色法测发酵液中可溶性磷的含量,每个试管菌株同时做 1 个平行实验。另外设置 1 个对照组,对照组在 250 mL 三角瓶装有相同的不含磷的基础液体培养液 100 mL 和磷矿粉 0.5 g,接种市售的一种解磷菌肥。

1.2.3 菌株鉴定 通过初筛和复筛,选取性能好的磷细菌作为最终的目的菌株,然后进行菌株形态、生理生化特征鉴定和 16S rDNA 区段序列分析。

菌株形态特征。 将挑选出的菌株平板培养 24 h,观察细菌菌落生长特征,注意其形状、大小、颜色、透明度等,并作记录,同时用接种环挑取单菌落上的细菌分别进行革兰氏染色镜检,记录结果。

菌株生理生化特性。 参照文献^[6-8]进行生理生化特征的观察,进行初步鉴定。

菌株 16S rDNA 区段序列测序。 将菌株接种于液体培养基中,摇床培养过夜后,离心收集菌体,用 PBS 缓冲液悬浮细胞后,抽提基因组总 DNA,然后 -20℃ 保存备用。选用细菌通用引物

27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492 r: 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'

PCR 反应按下列程序进行扩增: 95℃ 预变性 4 min, 95℃ 变性 30 s, 54℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 8 min, 若 PCR 产物经琼脂糖凝胶进行电泳检验后送上海杰李生物技术有限公司测序。序列提交 NCBI 网站, BLAST 程序与核酸数据库中的序列进行对比分析查找相同或相似的核苷酸序列,确定菌株的种属性质。

1.2.4 生长特性的研究 生长曲线的测定。将斜面活化后的解磷菌株接种至磷细菌液体培养基 100 mL 中, 30℃, 转速 130 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 条件下摇床培养,每隔 2 h 时测定光密度值 (OD_{600}), 以培养时间为横坐标, OD_{600} 为纵坐标绘制生长曲线。

糖发酵性能。 以葡萄糖、蔗糖、甘露醇、乳糖及淀粉作为糖源,分别加入磷细菌基础培养基中,并接入解磷目的菌株,分别置于 30℃,培养 2 d 后,观察并记录杜氏管内气体高度。

同化碳源。 以甘露醇,蔗糖,葡萄糖,淀粉,乳糖作为碳源,分别加入无碳源磷细菌基础培养基中,并接种解磷菌的菌株,于 28℃,培养 3 d 后,

用分光光度计于波长 600 nm 测定菌体 OD 值。

同化氮源。以酵母膏, 蛋白胨、硫酸铵、尿素、硝酸钾作为氮源, 加入磷细菌无氮基础培养基中, 并接入解磷菌的菌株, 分别置于 30℃, 培养 3 d 后, 用分光光度计于波长 600 nm 测定菌体 OD 值。

最适生长温度。在磷细菌基础培养基中分别接入磷细菌于不同温度 22℃、24℃、26℃、28℃、30℃、32℃、34℃、36℃、38℃和 40℃, 培养 3 d 后, 用分光光度计于波长 600 nm 测定菌体 OD 值。

最适 pH。调磷细菌基础培养基 pH 值为 4.5、5.5、6.0、7.0、7.5、8.0 和 8.5, 接入目的菌株, 分别置于 30℃, 培养 3 d 后, 用分光光度计于 600 nm 处测定菌体 OD 值。

2 结果与分析

2.1 菌株初筛

经过稀释涂平板法, 再对疑似菌株进行传代纯培养后, 在添加磷酸钙的磷细菌选择性培养基平板上, 可以看到有很明显的溶磷透明圈, 此圈即为解磷菌溶解了磷酸钙而形成的, 依据溶磷透明圈的大小, 筛选出了 4 株溶磷效果好的解磷菌, 分别命名为 L-P₁, L-P₂, L-P₃ 和 L-P₄ 这 4 株菌株即为初筛菌株。

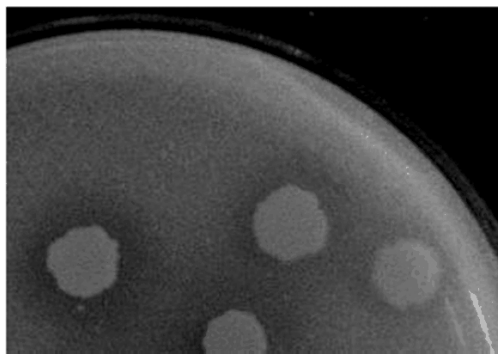


图 1 磷细菌形成的溶磷圈

Figure 1 Phosphorus-solubilizing circle formed by phosphorus bacteria L-P₁

2.2 菌株复筛

将初筛得到的 4 株磷细菌, 制备斜面试管菌种, 接种到磷矿粉液体培养基, 经过 7 d 的发酵后, 钼锑抗比色法测定其中的有效磷浓度, 结果见图 2。

对照组为 3.3 μg·mg⁻¹, 菌株 L-P₁ 达到了 5.3 μg·mg⁻¹, 比对照组高出 60.6%, 菌株 L-P₂ 则是 2.4 μg·mg⁻¹ 比对照组低 27.3%, 菌株 L-P₃ 达到了 3.6 μg·mg⁻¹ 比对照组高 9.1%, 菌株 L-P₄ 为 4.4 μg·mg⁻¹, 比对照组高 33.3%。

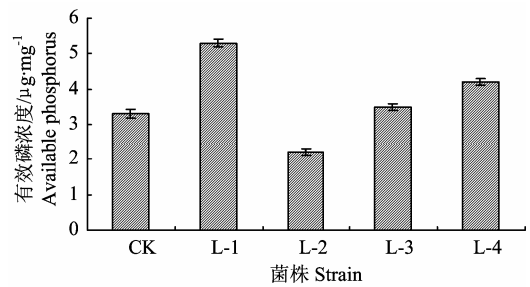


图 2 磷细菌分解磷矿粉后可溶性磷浓度

Figure 2 The available phosphorus at different stages in the culture

表 1 菌株 L-P₁ 的形态特征

Table 1 Morphological characteristics of strain L-P₁

特征 Characteristics	磷细菌 L-P ₁ Phosphobacteria
细胞 Cell	杆状, 大小约为 1.0×6.0 μm
革兰氏染色 Gram stain	阳性
菌落 Colony	乳黄色, 扁平, 边缘整齐, 颜色较暗, 直径 2~4 mm

表 2 菌株 L-P₁ 的生理生化特征

Table 2 Biochemical characteristics of strain L-P₁ and *Bacillus megaterium* strain

特征 Characteristics	磷细菌 L-P ₁ Phosphobacteria	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i> strain
细胞直径 > 1 μm	+	+
The diameter of cell	+	+
芽孢形状 Spore shape	V	V
接触酶 Catalase	+	+
V-P 实验 V-P test	—	—
葡萄糖产酸	+	+
Glucose produced acid	+	+
明胶液化	+	+
Gelatin liquefaction	+	+
淀粉酶 Amylase	+	+
利用柠檬酸盐	+	+
Citrate usage	+	+
卵磷脂酶 Lecithase	+	—
硝酸盐还原	+	+
Reduction of nitrate	+	+
无氮生长	—	—
Growth without nitrogen	—	—

由图 2 可见, 筛选的 4 株解磷菌与对照组相比, 菌株 L-P₁、L-P₃ 和 L-P₄ 均比对照组的解磷效果好, 尤其菌株 L-P₁ 的解磷效果比对照组高 60.6%, 但是筛选的菌株 L-P₂ 的解磷效果则比市售的解磷菌肥的解磷效果低 27.3%, 不如市售的解磷菌肥的解磷效力高。所以, 筛选的 4 株菌株有 3 株的解磷效果均比市售解磷菌肥的效果好, 可能的原因是市售解磷菌肥解磷菌的解磷效果本身就不是很高, 也可能

是长久的生产，其保存的解磷菌株经过多次活化传代培养，其解磷活力逐渐降低。所以，生产用的种子菌一定要经常测定其实际解磷效果，以保证产品的质量，同时也要继续探索高效菌株的筛选。根据发酵液有效磷浓度，确定菌株 L-P₁ 为最终的目的磷细菌菌株。

2.3 菌株鉴定

2.3.1 菌株形态特征 磷细菌 L-P₁ 形态特征观察实验结果见表 1。

2.3.2 菌株生理生化特性 经过对菌株主要生理生化特性实验，将磷细菌 L-P₁ 与巨大芽孢杆菌进行比较见表 2。

通过对表 1 和表 2 的分析比较，可以初步确定磷细菌 L-P₁ 为巨大芽孢杆菌。

2.2.3 菌株 16S rDNA 区段序列测序 对分离到的磷细菌 L-P₁ 进行 16S rRNA 区段序列测定，结果与 NCBI 数据库（美国国家科技情报研究中心）资料检索对比，测序结果如下：

```

TGCTCGCGGCGTGCCTATAATGCAAGTCGAGCGAACTG
ATTAGAAGCTTGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGG
TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGA
TAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCT
TCTCCTTCATGGGAGATGATTGAAAGATGGTTTCGGCT
ATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCC
GACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCG
CGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTTCGTAATACTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACTGCTCGTAC
CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGT
TATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGT
TTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTG
GAGGGTCATTGAAAACCTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAG
AGAAAAGCGGAATTCACGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTT
TTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTG
GAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGT
AAACGATGAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCGCCCTT
TAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGG
AGTACGGTGCAGAACTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTC
GAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
TCTGACAACTCTAGAGATAGAGCGTTCCCTTCGGGGA
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
GTCGTGAGATGTTGGGTAGTCCCGCACGAGCGCACCC
TTGATCTTAGTTGCAAGCATTTAGTTGGGCACCTCTAA
GGTGGACTGC
  
```

将测序结果在 GeneBank 上的 BLAST 进行比对，比对结果如图 3 所示。

由图 3 可知，所测序列通过 BLAST 比对，与

报道的 *Bacillus megaterium* strain（巨大芽孢杆菌，登录号为 KC311785.1）16SrDNA 同源性为 99%，且同样根据 Kuttzman&Robnet 所规定的同种内不同菌株间差异一般不超过 1%的标准，因此认定 L-P₁ 为巨大芽孢杆菌。

2.4 生长特性的研究

2.4.1 生长曲线的测定 由图 4 可见，菌株的停滞期在 6 h 左右，6 h 后进入对数生长期，至 24 h 左右达到生长稳定期，第 32 小时左右进入衰亡期。

2.4.2 磷细菌 L-P₁ 对糖发酵能力 L-P₁ 对糖发酵能力结果见图 5。

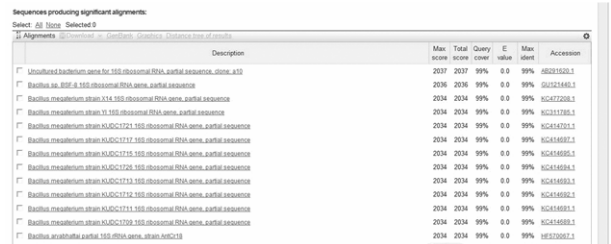


图 3 序列比对结果

Figure 3 Sequence alignment results

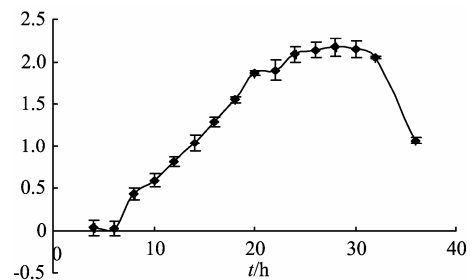


图 4 菌株 L-P₁ 的生长曲线

Figure 4 Growth curve of L-P₁ strain

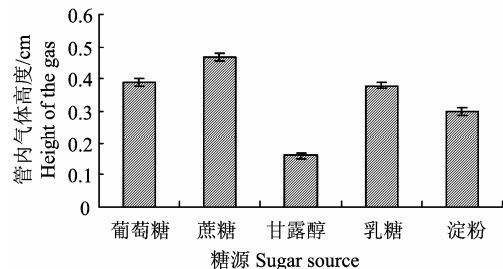


图 5 菌株对不同糖的发酵能力

Figure 5 The fermentation capability of the strain in different sugars

从图 5 可以看出，2 个菌株对不同糖源其发酵能力差异也较大，磷细菌 L-P₁ 对不同糖源发酵力最强的为甘露醇，最弱的为乳糖，依次是：甘露醇>蔗糖>葡萄糖>淀粉>乳糖。

2.4.3 磷细菌 L-P₁ 对碳源同化能力 菌株 L-P₁ 对不同碳源同化能力结果见图 6。

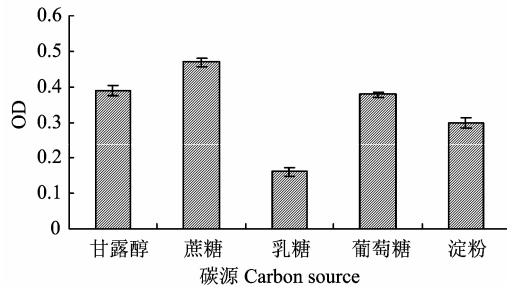


图 6 菌株对碳源的同化能力

Figure 6 The assimilation capacity of the strain in different carbon sources

从图 6 可以看出, 磷细菌 L-P₁ 对不同碳源同化力最强的为蔗糖, 最弱的为乳糖, 依次是: 蔗糖 > 甘露醇 > 葡萄糖 > 淀粉 > 乳糖。

2.4.4 磷细菌 L-P₁ 对氮源同化能力 磷细菌 L-P₁ 对氮源同化能力结果见图 7。

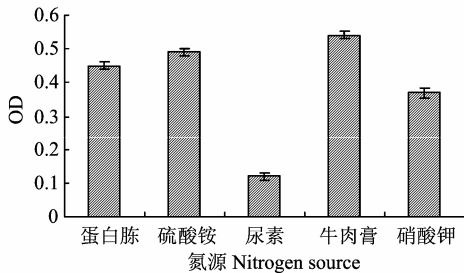


图 7 菌株对氮源的同化能力

Figure 7 The assimilation capacity of the strain in different nitrogen sources

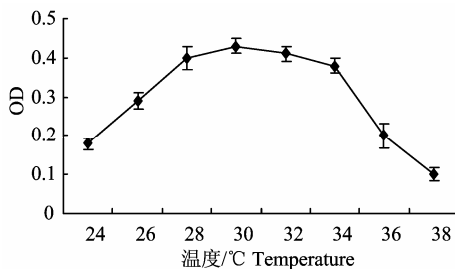


图 8 最适生长温度试验

Figure 8 Test of the optimum growth temperature for the strain

从图 7 可以看出, 磷细菌 L-P₁ 对不同氮源同化力最强的为牛肉膏, 最弱的为尿素, 依次是: 牛肉膏 > 硫酸铵 > 蛋白胨 > 硝酸钾 > 尿素。

2.4.5 磷细菌 L-P₁ 最适生长温度 磷细菌 L-P₁ 最

适生长温度结果见图 8。

从图 8 可以看出, 磷细菌 L-P₁ 随着温度的变化, 其 OD 值变化较缓和, 在 24~38℃ 的范围均可生长。在 28~32℃ 范围内, 其 OD 值变化比较小, 且此范围的 OD 值也比其他温度下的大, 所以磷细菌 L-P₁ 的最适生长温度为 28~32℃。

温度过高或者过低, 均会影响微生物体内酶的活性, 从而影响其进行正常的生长繁殖。

2.4.6 磷细菌 L-P₁ 最适 pH 磷细菌 L-P₁ 最适 pH 结果见图 9。

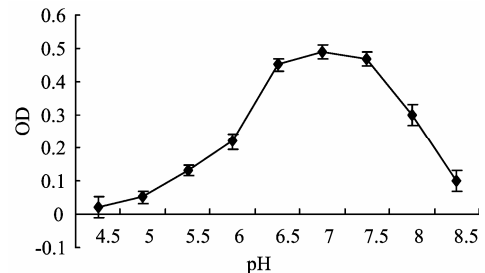


图 9 最适 pH 试验

Figure 9 Test of the optimum pH value for the strain

从图 9 可以看出, 磷细菌 L-P₁ 的 pH 生长范围为 5.5~8.5。pH 为 7~8 时, 此时磷细菌的 OD 值变化比较小, 所以磷细菌 L-P₁ 的最适 pH 生长范围为 pH7~8。培养液的 pH 值会直接影响到菌株体内的各种酶的活性, pH 偏高偏低, 对其酶的活性均产生不利的影响, 从而影响到菌株的生长和增殖。

3 讨论

土壤中能将难溶性磷转化为有效磷的微生物被称为解磷菌, 如芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*) 等^[9]。作者从四川自贡富顺县的田地中分离出解磷菌株后, 通过平板法和检测液体培养后的可溶性磷含量的方法比较了不同菌株解磷能力的大小, 筛选出 1 株高效解磷菌株。经过菌株形态、生理生化特征鉴定和 16S rDNA 区段序列分析, 得出筛选到的解磷细菌 L-P₁ 是 1 株巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium* strain), 这与实验前预期设想一致。

通过对该菌株生长特性的研究表明: 菌株对糖源的利用能力为: 甘露醇 > 蔗糖 > 葡萄糖 > 淀粉 > 乳糖; 对碳源的利用能力为蔗糖 > 甘露醇 > 葡萄糖 > 淀粉 > 乳糖; 对氮源的利用能力为牛肉膏 > 硫酸铵 > 蛋白胨 > 硝酸钾 > 尿素。磷细菌的最适生长温度为 28~32℃, 最适 pH 生长范围为 pH7~8, 培养 28 h 菌体

生物量达到最大。但是要想进一步应用到微生物肥料的生产中,还必须考虑菌株在肥料基质中的生长情况,因为选用不同的原料作为肥料基质,会对微生物的生长产生不同的影响。

此外,进一步研究解磷微生物与土壤中其它有益微生物如固氮菌、解钾菌等的相互作用机理,开发出复合型的微生物肥料,可以充分发挥出微生物肥料的优势,这也将是以后研究的重点。

参考文献:

- [1] 郑世仲, 江胜滔, 黄燕翔, 等. 土壤中有机磷解磷细菌的分离筛选及鉴定[J]. 安徽农学通报, 2009, 15(15): 24-25.
- [2] Tao G C, Tian S J, Cai M Y, et al. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils[J]. *Pedosphere*, 2008, 18(4): 515-523.
- [3] 冯月红, 姚拓, 龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展[J]. 草原与草坪, 2003(5): 3-7.
- [4] 李华芝, 李秀艳, 韩波波. 高温菌的生理生化及其 16SrDNA 序列分析[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(8): 24-27.
- [5] 吴拥军, 王嘉福. 应用 16SrDNA 鉴定食品中的双歧杆菌[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 359-361.
- [6] 蒋宝贵, 赵斌. 解磷解钾自生固氮菌的筛选分离及鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2005, 24(1): 43-48.
- [7] 王莉晶. 高效解磷菌的筛选及其对小麦生长的影响[D]. 大连: 大连理工大学, 2008.
- [8] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社.
- [9] 卢金珍, 许宁, 熊汉国. 高效解磷突变株的选育[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(2): 328-329.