



有机磷降解菌的筛选及其促生特性

王欢^{1,2}, 王敬敬², 徐松², 赵维², 韩一凡², 王兴彪², 黄志勇^{2*}

¹天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

²天津市工业生物系统与过程工程重点实验室, 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

摘要:【目的】从环境中筛选高效有机磷降解菌及研究其促生机制。【方法】利用蒙金娜有机磷培养基筛选有机磷降解菌, 用生化实验对其促生特性进行研究, 且通过盆栽实验筛选对黄瓜苗有促生作用的高效有机磷降解菌。【结果】从草坪根周筛选到 35 株有机磷降解菌, 选择 5 株代表性菌进行黄瓜盆栽实验。结果表明 G3-6 有机磷降解能力最强, 溶磷圈直径(HD)与菌落直径(CD)比值为 3.28, 且对黄瓜苗的促生效果优于其他菌株。与 CK 相比, G3-6 可提高黄瓜苗鲜重 71.53%、干重 69.78%和株高 33.55%; 与阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 相比, G3-6 可提高黄瓜苗鲜重 2.52%、干重 21.14%和株高 8.27%。相关分析结果表明降解有机磷能力在促进植物生长过程中可能发挥着比其他功能更重要的作用。16S rRNA 序列分析初步鉴定 G3-6 为假单胞菌属。【结论】假单胞菌 G3-6 除具有较强的有机磷降解、分泌 IAA 和铁载体能力, 对黄瓜苗也有较好的促生作用, 是 1 株潜在的具有广阔市场应用价值的高效促生菌。

关键词: 有机磷降解菌, 筛选, 促生机制, 黄瓜

磷元素是植物生长所需的主要营养元素之一, 土壤中的磷主要以难溶性磷酸盐形式存在。为了提高农产品的产量, 人们长期大量施用磷肥。磷肥在施用后很快就被固定形成无效态磷, 变得不可利用, 造成了作物的低吸收和磷元素在土壤中的大量积累^[1]。提高土壤中磷的利用率一直是农业科技工作者研究的热点课题之一。大量的研究表明, 土壤中存在着一一些微生物, 能够将植物难

以吸收利用的磷转化为可吸收利用的状态, 这些微生物称为解磷菌。解磷菌分为 2 种, 分别是解无机磷细菌和有机磷降解细菌。解无机磷细菌的主要作用是分解无机磷化物, 如磷酸钙、磷灰石等, 其作用机理是借助细菌生命活动过程中所产生的酸溶解无机磷; 有机磷降解细菌的主要作用是分解有机磷化合物, 如核酸、磷脂等, 其作用机理主要是借助于细菌生命活动中所产生的酶降

基金项目: 国家自然科学基金(31500424); 中国科学院科技服务网络计划(STS 计划)(KFJ-SW-ST-143-6); 宁波大学水产浙江省重中之重一级学科开放基金资助(xkzsc10); 天津市留学回国人员科技活动启动项目(2016019)

*通信作者。Tel/Fax: +86-22-84861931; E-mail: huang_zy@tib.cas.cn

收稿日期: 2016-09-05; 修回日期: 2016-10-28; 网络出版日期: 2016-12-08

解有机磷^[2]。

目前国内外对有机磷降解菌的研究已有很多报道,尤其是有机磷降解菌对有机磷化肥和农药降解的报道。自然环境中存在的部分细菌、真菌、放线菌和藻类等对有机磷具有降解作用,研究比较深入的有细菌和真菌。细菌主要包括假单胞菌属、芽孢杆菌属、节杆菌属、棒状杆菌属、黄杆菌属、固氮菌属和硫杆菌属等^[3];真菌主要有曲霉属、青霉属、木霉属和酵母菌等^[4]。从环境中筛选高效有机磷降解菌,研制生产含有解磷功能的微生物肥料对解决植物磷素供应问题是一条很好的途径。近年来,有机磷降解菌的应用也引起人们的关注,在农作物上的应用已有一些报道,但是高效有机磷降解菌在黄瓜上的应用却鲜有报道。

本研究拟通过选择性培养基从环境中筛选有机磷降解菌,利用生化实验对其促生特性进行初步研究,最终通过盆栽实验筛选出对黄瓜苗有促生作用的高效有机磷降解菌。本文将初步研究有机磷降解菌的生态分布及其促进黄瓜生长的机制,最终可为今后开发含有有机磷降解功能的微生物肥料提供充足的菌种准备,促进有机磷降解菌微生物肥料的蓬勃发展。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源:本实验所采用的环境样品分别来自中国科学院天津工业生物技术研究所院内的草坪根系、根周土壤样品、根际土壤样品,以及湖水样品。土壤采样深度为5–10 cm,湖水采样深度为表层0–10 cm。将采集的土壤和湖水样品分别贮存于透明封口袋和封口瓶内并编号,4 °C冰箱中保存,备用。

1.1.2 培养基:有机磷液体培养基(蒙金娜培养基)(g/L)^[5]:葡萄糖 10.00, (NH₄)₂SO₄ 0.50, MgSO₄·7H₂O 0.30, NaCl 0.30, KCl 0.30, FeSO₄·7H₂O 0.03, MnSO₄·H₂O 0.03, CaCO₃ 5.00, 蒸馏水 1 L, pH 7.0–7.5。将蒙金娜基础培养基融化冷却至 50 °C 后,立即加入蛋黄液(蛋黄液为 0.8% 无菌生理盐水与鸡蛋黄 1 : 1 配制),每 100 mL 的基础培养基加卵黄稀液 3–4 mL 作为有机磷源,混匀后分装于培养皿内凝成平板。

有机磷固体培养基:在有机磷液体培养基的基础上加入琼脂粉 18–20 g/L。

King 培养基(g/L)^[6]:蛋白胨 20.0,甘油 15 mL, K₂HPO₄ 1.5, MgSO₄·7H₂O 1.5, 色氨酸 0.1, pH 7.2 (用 KOH 调 pH)。

PDA 培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20,蒸馏水 1 L。配制方法:取马铃薯 200 g 去皮,切成小块,取适量蒸馏水煮沸 0.5 h 后取汁,补水定容至 1 L,加入葡萄糖和琼脂,115 °C 灭菌 20 min。

1.2 有机磷降解菌的筛选与测定

1.2.1 有机磷降解细菌的分离与筛选:分别称取保存的根周土壤样品、根际土壤样品各 1 g、湖水样品 1 mL 加入到装有 9 mL 无菌水的试管中,用移液枪吹打混匀,静置 5 min 左右,用微量移液器按顺序吸取 1 mL 的悬液到 99 mL 的有机磷液体培养基中,置于摇床 180 r/min、30 °C 培养 72 h。再分别吸取 1 mL 上述摇瓶培养液于盛有 9 mL 无菌水的试管中,吹打混匀,吸取 1 mL 菌悬液进行 10 倍梯度稀释,将浓度为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 和 10⁻⁸ 的稀释液各吸取 0.1 mL 分别接到有机磷固体培养基上,用涂布棒涂抹均匀后倒置于 30 °C 生化培养箱中培养 7 d。挑取平板上透明圈

较明显的菌落, 在有机磷固体培养基上进行重复划线、分离、纯化。

1.2.2 内生有机磷降解菌的分离与筛选:将草根系(分主根和次根)用自来水冲洗干净, 滤纸吸去水分, 用 75% 的酒精浸泡 5 min, 无菌水冲洗 4 次, 再用 6% H_2O_2 浸泡 15 min, 无菌水冲洗 5 次, 无菌滤纸吸干水分。称取无菌的根 1 g, 剪碎于无菌研钵中, 加入 9 mL 无菌水研碎。静置 15 min 后, 用无菌移液枪吸取 200 μ L 涂布于有机磷固体培养基平板上, 30 °C 培养 7 d。取冲洗的无菌水 1 mL 置入有机磷固体培养基表面, 作为对照。挑取平板上透明圈较明显的菌落, 在有机磷固体培养基上进行重复划线、分离、纯化。

1.2.3 有机磷降解能力的测定:将具有稳定有机磷降解的细菌点布于有机磷固体培养基上, 并测量其溶磷圈直径(HD)和菌落直径(CD)。有机磷降解菌的溶磷圈直径(HD)与菌落直径(CD)的比值越大, 有机磷降解效果越好。

1.3 有机磷降解菌的促生特性研究

1.3.1 解无机磷能力的测定:将有机磷降解菌在牛肉膏蛋白胨液体培养基^[7]中摇床培养 1–2 d 后, 用移液枪吸取 5 μ L 接种到无机磷固体培养基^[7]上, 放置于培养箱中 30 °C 培养 2–3 d, 观察菌落是否生长, 有无透明圈形成。

1.3.2 固氮能力的检测:将有机磷降解菌在牛肉膏蛋白胨液体培养基中摇床培养 24 h, 吸取 5 μ L 菌液点接在阿须贝固氮培养基^[7]上, 30 °C 静置培养 3 d, 观察是否有菌落形成。

1.3.3 铁载体的检测:将有机磷降解菌在牛肉膏蛋白胨液体培养基中摇床培养 24 h, 吸取 5 μ L 菌液点接在 CAS 平板^[7]上, 30 °C 静置培养 3 d, 观察其菌落在 CAS 平板上是否产生橙色铁螯合圈。

1.3.4 3-吲哚乙酸的测定:将有机磷降解菌接种

到 King 培养基中, 30 °C、200 r/min 摇床培养 24 h。取 3 mL 菌液 12000 r/min 离心 15 min。取 1 mL 的上清液加入 2 mL 的 Salkowski's^[7]反应液, 混匀, 在暗处反应 30 min 后, 在紫外分光光度计上选择波长 530 nm 测吸光度值。每个样品设置 3 个重复。

IAA 标准曲线制作方法: 配置浓度为 0、5、10、20、30、40、50、60 mg/L 的 IAA 标准溶液。分别取不同浓度的 IAA 溶液, 加入 2 mL 的 Salkowski's 反应液, 混匀, 在暗处反应 30 min 后, 在紫外分光光度计上选择波长 530 nm 测吸光度值。每个样品设置 3 个重复。

1.3.5 拮抗植物病原菌能力的测定:将有机磷降解菌在牛肉膏蛋白胨液体培养基中摇床培养 24 h 后, 配制成浓度约为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 吸取 5 μ L 菌悬液, 分别点接在 PDA 平板的边缘。在 PDA 平板中央分别放置直径为 5 mm 的 3 种植物病原菌(立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌)的菌丝体。30 °C 同步培养 3–5 d, 观察是否有抑菌圈产生。

1.4 盆栽实验

1.4.1 供试土壤和植株:供试土壤为天津市东丽区华明镇的耕地土壤, 土壤类型为黄壤。土壤性质为: 有机质 0.41%; 全氮 655 mg/kg, 全磷 250 mg/kg, 全钾 4893 mg/kg; 速效氮 18.82 mg/kg; 速效磷 155.11 mg/kg; 速效钾 124.39 mg/kg; pH 8.14。供试作物为黄瓜(津优一号), 将黄瓜种子浸种发芽, 在苗床中育种 5 d 后, 选取大小一致的植株作为实验植株。供试菌株为有机磷降解效果较好且有差异的有机磷降解细菌。阳性对照为枯草芽孢杆菌 F-H-1。细菌接种量为 1×10^8 CFU/g 土壤。

1.4.2 试验方法:将有机磷降解菌在人工气候培养箱中进行黄瓜盆栽实验, 从而筛选出对黄瓜有促生作用的高效有机磷降解菌。首先将 300 g 供试

土壤装入直径为 8 cm 的花盆中,每个花盆中移栽 2 株黄瓜苗。将在牛肉膏蛋白胨培养基中培养 36 h 的细菌进行离心(5000×g, 7 min, 10 °C),用 0.9% 生理盐水冲洗 3 次,收集菌体,用无菌蒸馏水稀释到浓度为 3×10^{11} CFU/mL 的菌悬液。每个花盆中添加 100 mL 菌悬液,每个处理 10 个重复。等量蒸馏水处理作为空白对照。将黄瓜放置于人工气候培养箱中进行培养(28 °C, 9 h 光照, 17 °C, 15 h 无光照,湿度为 75%),并进行统一管理(每 48 h 浇水 30 mL),培养 35 d。实验结束后,对黄瓜苗的茎高、根长、茎鲜重、根鲜重、茎干重及根干重进行测量^[7]。

利用 SPSS17.0 软件对有机磷降解的促生特性和促生效果进行相关分析。

1.5 高效解磷促生菌 16S rRNA 的测定

使用 TIANGEN 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取高效有机磷降解促生菌的基因组 DNA。利用 PCR 对基因组 DNA 的 16S rRNA 基因片段进行扩增。50 μL 扩增体系为: 25 μL PCR Master-Mix (赛默飞世尔科技公司), 2 μL 上游引物 27F (10 μmol/L), 2 μL 下游引物 1492R (10 μmol/L)^[7], 2 μL DNA 模板, 19 μL 无菌水。PCR 扩增条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物序列测定委托北京金维智生物技术有限

公司完成。基因比对通过美国国家生物技术信息中心 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)在线完成。

2 结果和分析

2.1 有机磷降解菌筛选结果

利用有机磷培养基平板划线法,从草坪根周土壤稀释度为 1×10^{-7} 的 3 个平板中共筛选 153 株可产生明显透明圈的有机磷降解菌。经过 4 次反复划线培养后,获得 35 株具有稳定有机磷降解能力的菌株(表 1)。从根际土壤中初筛到大量可在有机磷培养基上生长的菌株,但是这些菌落周围均无透明圈产生。经过 4 次反复划线培养后,未获得稳定有机磷降解能力的菌株。从根系内部未筛选到具有有机磷降解能力的菌株。从湖水样品中初筛到 49 株可产生透明圈的有机磷降解菌,经过 4 次反复划线培养后,获得 0 株具有稳定有机磷降解能力的菌株。

将 35 株具有稳定有机磷降解能力的菌株进行解磷能力测定。结果如表 2 所示,35 株有机磷降解菌的溶磷圈直径(HD)与菌落直径(CD)比值范围在 0.10–3.28。HD/CD>3 的菌株有 4 株(G1-13、G3-6、G2-1 和 G1-23),占总数的 11.42%; $3 > \text{HD}/\text{CD} > 2$ 的菌株有 10 株,占总数的 28.57%; 其中 G1-13

表 1. 有机磷降解菌筛选结果

Table 1. Screening result of organophosphate-degradation bacteria

Sample sites	First screening	Fourth screening	Introduction
Bulk soil of grass	153	35	153 bacterial strains with the hydrolysis circle
Rhizosphere soil of grass	0	0	The bacterial strains grew well, but no bacterial strain with the hydrolysis circle
Inner of grass root	0	0	No bacterial strains grew
Water of the lake	49	0	49 bacterial strains with the not obvious hydrolysis circle
Total	202	35	35 bacterial strains with the hydrolysis circle

表 2. 35 株有机磷降解菌促生特性的初步研究结果

Table 2. The growth-promoting mechanism of 35 strains of organophosphate-degradation bacteria

Strains	Organophosphate-degradation(HD/CD)	Inorganic phosphorus-solubilizing capacity/cm	phosphorus- IAA production capacity/(mg/L)	Siderophores production capacity/cm	Nitrogen-fixing capacity	The antagonistic microbe to the fungi		
						<i>Rhizoctoniasolani</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium graminearum</i>
G1-13	3.28	—	9.27	0.60	+	—	—	—
G3-6	3.28	—	9.81	0.50	—	—	—	—
G2-1	3.14	—	9.54	0.60	—	—	—	—
G1-23	3.13	—	4.90	0.50	—	—	—	—
G1-29	2.87	—	6.00	0.50	—	—	—	—
G3-18	2.85	—	5.45	0.60	—	—	—	—
G1-4	2.85	—	5.45	0.70	—	—	—	—
G2-7	2.75	—	4.72	0.60	—	—	—	—
G1-41	2.62	—	5.22	0.60	—	—	—	—
G1-35	2.50	—	5.50	0.50	—	—	—	—
G3-40	2.50	—	5.27	0.50	—	—	—	—
G3-20	2.33	—	4.86	0.70	—	—	—	—
G2-2	2.25	—	5.50	0.70	—	—	—	—
G2-49	2.00	—	5.00	0.60	—	—	—	—
G3-26	2.00	0.30	14.72	0.90	+++	—	—	—
G1-8	1.70	0.70	10.77	0.60	++	—	—	—
G3-4	1.55	—	5.09	0.60	—	—	—	—
G1-25	1.50	—	5.13	0.70	—	—	—	—
G2-26	1.50	—	5.36	0.60	—	—	—	—
G1-1	1.44	—	6.09	0.50	—	—	—	—
G1-3	1.00	—	5.63	0.50	+	—	—	—
G1-34	0.55	—	5.18	0.60	—	—	—	—
G2-29	0.50	—	5.04	0.60	—	—	—	—
G2-28	0.40	—	5.00	0.70	++	—	—	—
G1-11	0.33	0.80	4.77	—	—	—	—	—
G1-18	0.29	2.30	13.00	0.50	++	—	—	—
G1-30	0.28	—	4.45	0.70	—	—	—	—
G1-33	0.25	0.50	15.27	0.40	—	—	—	—
G1-38	0.25	—	6.27	0.60	—	—	—	—
G2-21	0.25	1.20	7.09	0.70	+	—	—	—
G1-36	0.20	—	5.22	—	++	—	—	—
G2-15	0.13	0.50	7.72	0.60	++	—	—	—
G3-39	0.12	—	9.04	—	++	—	+	—
G1-52	0.11	0.20	11.77	0.70	+++	—	—	—
G2-51	0.10	1.20	7.77	0.50	+	—	—	—

+++ : the activity is strongest; ++ : the activity is stronger; + : the activity is weaker; — : no activity.

和 G3-6 的解磷圈最明显, 其 HD/CD 值为 3.28, G2-51 的解磷圈最小, 其 HD/CD 值为 0.10。

2.2 有机磷降解菌促生特性研究

2.2.1 解无机磷能力的测定: 对 35 株有机磷降解菌的解无机磷能力在无机磷培养基上进行测定, 结果表明 9 株有机磷降解菌具有分解无机磷的能力(表 2)。这 9 个菌株均产生了明显的水解圈, 其溶磷圈范围在 0.2–2.3 cm, 溶磷圈 ≥ 2 cm 的菌株只有 1 株, 为 G1-18; $2 \text{ cm} >$ 溶磷圈 ≥ 1 cm 的菌株有 2 株, 占总数的 22.22%, 溶磷圈 < 1 cm 有 6 株, 其中最小的是 G1-52, 为 0.2 cm。

目前报道比较多的解无机磷菌有细菌和真菌, 真菌报道的较少, 范丙全等^[8]在测定溶磷草酸青霉菌溶磷圈时得出培养 7 d 时的值为 5.05 cm。细菌相对较多, 林启美等^[9]测得假单胞菌属培养 7 d 时溶磷圈值为 0.3–1.0 cm; 芽孢杆菌属培养 7 d 时溶磷圈值范围是 0.4–0.5 cm。银婷婷等^[7]测得葡萄糖杆菌属培养 3 d 时溶磷圈直径为 2.55 cm。冀玉良等^[10]筛选到 10 株既能溶解无机磷又能溶解有机磷的根瘤菌, 有机磷降解效果最好的菌 SLCH171, 其有机磷降解圈 HD/CD 值最大(2.55), 且解无机磷圈 HD/CD 值也最大(2.35)。而本研究中, 也筛选到 9 株同时具有有机磷降解能力和解无机磷能力的菌种。

2.2.2 固氮能力的检测: 通过阿须贝固氮平板培养, 从 35 株有机磷降解菌中筛选到 12 株具有固氮能力的有机磷降解菌。这 12 株菌株均可在阿须贝固氮培养基上生长, 其中 G3-26 和 G1-52 这 2 株菌生长最好, 菌落较大; G1-8、G1-18、G1-36、G2-15、G2-28 和 G3-39 这 6 株菌生长良好; G1-3、G1-13、G2-21 和 G2-51 这 4 株菌生长一般, 菌落较小(表 2)。周德明等^[11]筛选到 5 株兼具有有机磷降解能力和固氮能力的根际菌, 因为本实验只是

用化学定性法初步确定有机磷降解菌具有固氮能力, 需要进一步用化学定量法比较它们的解磷、固氮能力。

2.2.3 铁载体的检测: 将有机磷降解菌在 CAS 平板上培养 3 d 后, 检测其是否产生铁载体。由表 2 可知, 35 株有机磷降解菌中 30 株能产生橙色铁螯合圈, 晕圈直径范围在 0.1–0.9 cm 之间。相同条件下, 晕圈直径越大的细菌产铁载体能力越高。橙黄色晕圈直径 > 0.5 cm 的有 31 株, 其中, G3-26 的橙黄色晕圈直径最大, 为 0.9 cm; G1-33 最小, 为 0.4 cm; 无橙黄色晕圈的菌株有 3 株, 分别为 G1-11、G1-36 和 G3-39。目前对有机磷降解菌产铁载体能力的报道还较少, 需要进一步从有机磷降解菌的生存环境和生理功能来探究它们的差异。

2.2.4 3-吲哚乙酸的测定: 使用 IAA 标准品绘制了标准曲线(图 1)。标准曲线方程如下 $y=0.022x+0.039$, x 代表 IAA 浓度数值(mg/L), y 代表 OD_{530} 。 $R^2=0.994$, 说明绘制的标准曲线比较准确。

对分离获得的 35 株有机磷降解菌株分泌植物生长激素(IAA)特性利用分光光度计进行测定, 将测得的 OD 值代入标准曲线获得产 3-吲哚乙酸的量。测定结果表明 35 株有机磷降解菌均具有分泌 IAA 的能力, 分泌量为 4.45–15.27 mg/L (表 2)。分泌 IAA 能力大于 10 mg/L 的菌株有 5 株(G1-33、

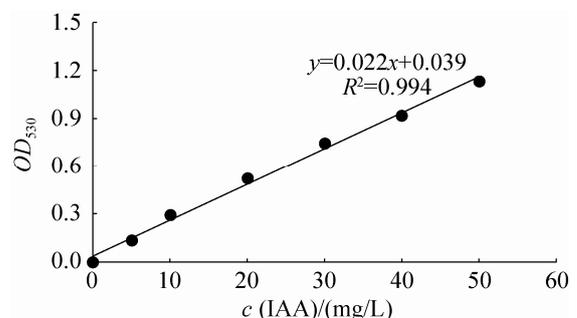


图 1. IAA 标准曲线

Figure 1. IAA standard curve.

G3-6、G1-18、G1-52 和 G1-8), 占总数的 14.28%, 其中 G1-33 分泌 IAA 的能力最强, 其分泌 IAA 的量为 15.27 mg/L。G1-30 分泌 IAA 的能力最小, 其分泌量为 4.45 mg/L。

张英等^[12]研究发现从三叶草中筛选 7 株有机磷降解菌能分泌 IAA, 分泌量在 0.36–20.39 mg/L, 菌株 ls-5 分泌 IAA 的能力最强(20.39 mg/L)。本研究所筛选的 35 株有机磷降解菌均分泌生长激素 IAA, 分泌量为 4.45–15.27 mg/L, 最高值略低于张英的测量结果。出现这种现象的原因可能与菌株种类、生理和生态特性及培养条件等因素有关。

2.2.5 拮抗植物病原菌能力的测定: 通过平板对峙实验检测 35 株有机磷降解菌拮抗病原菌(立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、禾谷镰刀菌)的能力, 结果表明只有 G3-39 对尖孢镰刀菌有较大的抑菌圈(图 2)。王义等^[13]筛选的菌株 PSB26 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和卵磷脂的效果最好, 同时对包括尖孢镰刀菌在内的 6 个常见病原菌都有一定的拮抗作用。尖孢镰刀菌是一类既可侵染植物又可在土壤内生存的兼性寄生真菌, 是植物枯萎病的主要致病菌。本研究筛选的 G3-39 对尖孢镰刀菌具有较高的拮抗活性, 说明其具有防治枯萎病的潜在应用价值。

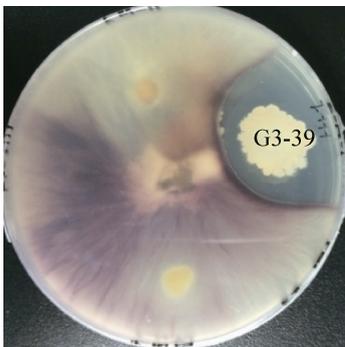


图 2. 有机磷降解菌 G3-39 对尖孢镰刀菌的抑菌圈
Figure 2. Antibacterial circle of G3-39 to *Fusarium oxysporum*.

2.3 黄瓜盆栽实验

从 35 株有机磷降解菌中, 分别选择有机磷降解能力最强的菌株(G1-13 和 G3-6)、解无机磷能力最强的菌株(G1-18)、产铁载体和固氮能力最强的菌株(G3-26)、有机磷降解能力和分泌 IAA 能力都较强的菌株(G1-8), 共 5 株菌进行黄瓜盆栽实验, 以筛选出促生效果最好的有机磷降解菌, 并结合其促生活性推测其促进黄瓜生长的机制。

这 5 株菌均可提高黄瓜苗的茎鲜重, 提高范围在 23.60%–79.67%。菌株 G3-6 提高能力最强, 可提高黄瓜苗的茎鲜重 79.67%。而且 5 株菌中只有 G3-6 提高黄瓜苗茎鲜重的能力高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (75.08%), 结果如表 3 所示。同时, 这 5 株菌能明显促进黄瓜苗的根系发育, 其根鲜重有显著提升, 提高范围在 10.55%–79.07%。菌株 G1-18 提高能力最强, 可提高黄瓜苗的根鲜重 79.07%。这 5 株菌中有 3 株(G1-18、G3-26 和 G3-6) 提高黄瓜苗根鲜重的能力高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (29.37%)。对整个植株而言, 5 株菌均可提高黄瓜苗的鲜重, 提高范围在 22.61%–71.53%。菌株 G3-6 提高能力最强, 可提高黄瓜苗的鲜重 71.53%。这 5 株菌中只有 G3-6 提高黄瓜苗鲜重的能力高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (66.98%)。

分离菌株对黄瓜苗干重有显著影响。5 株菌均可提高黄瓜苗的茎干重, 提高范围在 19.46%–94.18%。菌株 G3-6 提高能力最强, 可提高黄瓜苗的茎干重 94.18%。这 5 株菌中只有 G3-6 提高黄瓜苗茎干重的能力高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (60.43%), 结果如表 4 所示。同时, 5 株菌均可提高黄瓜苗的根干重, 提高范围在 20.72%–68.66%。菌株 G1-18 提高能力最强, 可提高黄瓜苗的根干重 68.66%。这 5 株菌提高黄瓜苗根干重的能力均高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (12.11%)。另外, 5 株菌

表 3. 有机磷降解菌对黄瓜茎鲜重、根鲜重及整个植株鲜重的影响

Table 3. Effects of organophosphate-degradation bacteria on stem fresh weight, root fresh weight and plant fresh weight of cucumbers

Treatment	Stem fresh weight		Root fresh weight		Plant fresh weight	
	Value/g	Increase rate/%	Value/g	Increase rate/%	Value/g	Increase rate/%
CK	1.70±0.23	–	0.14±0.06	–	1.84±0.27	–
F-H-1	2.98±0.26	75.08	0.19±0.04	29.37	3.17±0.30	66.98
G1-8	2.31±0.23	36.01	0.16±0.03	10.55	2.47±0.24	31.50
G1-13	2.50±0.29	47.01	0.18±0.17	23.57	2.68±0.35	42.85
G1-18	2.14±0.89	25.74	0.26±0.11	79.07	2.40±0.98	31.17
G3-6	3.06±0.40	79.67	0.19±0.04	33.74	3.25±0.43	71.53
G3-26	2.10±0.54	23.60	0.22±0.07	53.11	2.32±0.61	22.61

表 4. 有机磷降解菌对黄瓜茎干重、根干重及整个植株干重的影响

Table 4. Effects of organophosphate-degradation bacteria on stem dry weight, root dry weight and plant dry weight of cucumbers

Treatment	Stem dry weight		Root dry weight		Plant dry weight	
	Value/g	Increase rate/%	Value/g	Increase rate/%	Value/g	Increase rate/%
CK	0.17±0.01	–	0.025±0.01	–	0.195±0.01	–
F-H-1	0.27±0.01	60.43	0.028±0.01	12.11	0.298±0.02	43.27
G1-8	0.22±0.01	30.09	0.030±0.01	20.72	0.250±0.01	26.76
G1-13	0.24±0.02	39.71	0.031±0.01	26.38	0.271±0.03	34.97
G1-18	0.20±0.12	19.46	0.040±0.02	68.66	0.240±0.15	29.05
G3-6	0.33±0.02	94.18	0.031±0.01	25.48	0.361±0.03	69.78
G3-26	0.21±0.07	24.86	0.035±0.01	41.35	0.255±0.08	28.07

均可提高黄瓜苗整个植株的干重，提高范围在 26.76%–69.78%。菌株 G3-6 提高能力最强，可提高黄瓜苗的干重 69.78%。这 5 株菌中只有 G3-6 提高黄瓜苗干重的能力高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (43.27%)。

这 5 株菌对黄瓜苗株高的影响如表 5 所示。5 株菌中有 3 株菌可提高黄瓜苗的茎高，提高范围在 17.46%–35.46%。菌株 G3-6 提高能力最强，可提高黄瓜苗的茎高 35.46%。这 3 株菌提高黄瓜苗茎高的能力均高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1

(14.99%)。同时，5 株菌中有 3 株菌可提高黄瓜苗的根长，提高范围在 14.34%–32.56%。菌株 G1-13 提高能力最强，可提高黄瓜苗的根长 32.56%。但是这 3 株菌提高黄瓜苗根长的能力均低于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (42.85%)。5 株菌中有 3 株菌可提高黄瓜苗整个植株的株高，提高范围在 16.52%–33.55%。菌株 G3-6 提高能力最强，可提高黄瓜苗的株高 33.55%。这 3 株菌中只有 G1-13 和 G3-6 提高黄瓜苗株高的能力高于阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 (23.38%)。

表 5. 有机磷降解菌对黄瓜茎高、根长及整个植株高的影响

Table 5. Effects of organophosphate-degradation bacteria on stem height, root height and plant height of cucumbers

Treatment	Stem height		Root height		Plant height	
	Value/cm	Increase rate/%	Value/cm	Increase rate/%	Value/cm	Increase rate/%
CK	12.42±1.79	–	5.41±0.61	–	17.83±1.92	–
F-H-1	14.28±4.28	14.99	7.72±1.22	42.85	22.00±2.00	23.38
G1-8	14.59±4.59	17.46	6.18±0.92	14.34	20.78±0.78	16.52
G1-13	15.48±5.48	24.60	7.17±1.04	32.56	22.65±2.65	27.00
G1-18	11.78±2.47	–5.20	5.30±1.00	–2.04	17.08±2.96	–4.24
G3-6	16.83±6.83	35.46	6.98±0.56	29.12	23.82±3.82	33.55
G3-26	12.02±1.64	–3.24	5.30±1.24	–1.93	17.32±2.19	–2.84

通过对黄瓜植株的鲜重、干重和株高数据的综合分析发现, G3-6 对黄瓜植株的促生作用明显高于其他菌株, 与空白对照相比, 可提高黄瓜苗鲜重 71.53%、干重 69.78%和株高 33.55%, 与阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 相比, 可提高黄瓜苗鲜重 2.52%、干重 21.14%和株高 8.27%。G1-18 对黄瓜植株的促生作用较差, 与空白对照相比, 可提高黄瓜苗鲜重 31.17%、干重 29.05%, 株高略低于空白对照 4.24%, 但是其对根鲜重、根干重促生效果较好, 与空白对照相比, 可提高黄瓜苗根鲜重 79.07%、根干重 68.66%, 明显高于 F-H-1 和 G3-6, 这可能由于 G1-18 对黄瓜苗根部有较强的促生作用。

2.4 有机磷降解菌促生机制的初步研究

5 株有机磷降解的促生特性和促生效果的相关性分析如表 6 所示。结果显示, 吲哚乙酸(IAA)的分泌能力与黄瓜苗相关性最高, 相关性 r 绝对值在 0.5–0.9。吲哚乙酸(IAA)与黄瓜苗的茎高、根长、株高显著负相关, 且相关性均为–0.9 以上。吲哚乙酸(IAA)与黄瓜苗的茎鲜重、鲜重、茎干重和干重具有负相关性, 而与根鲜重和根干重具有正相关性。

有机磷降解能力(OP)与黄瓜苗的各项指标均具有较高的相关性, 相关性 r 绝对值均在 0.6–0.8。有机磷降解能力(OP)与黄瓜苗的茎高、根长、株高、茎鲜重、鲜重、茎干重和干重具有正相关性, 而与根鲜重和根干重具有负相关性。

解无机磷能力(IP)与黄瓜苗的相关性 r 绝对值在 0.4–0.8。解无机磷能力(IP)与黄瓜苗的茎高、根长、株高、茎鲜重、鲜重、茎干重和干重具有负相关性, 而与根鲜重和根干重具有正相关性。

分泌铁载体的能力(SI)与黄瓜苗的相关性最低, 相关性 r 绝对值在 0.02–0.50。分泌铁载体的能力(SI)与黄瓜苗的茎鲜重和鲜重具有负相关性, 而与茎高、根长、株高、根鲜重、茎干重、根干重和干重没有相关性。

2.5 高效促生解磷菌 16S rRNA 的测定

本研究通过 16S rRNA 序列分析及 NCBI 数据库 BLAST 在线比对(表 7), 有机磷降解菌 G3-6 与 *Pseudomonas* sp. 相似度为 100%, G1-13 和 G1-8 与 *Stenotrophomonas maltophilia* 相似度为 100%, G1-18 与 *Cedecea neteri* 相似度为 99%, G3-26 与 *Pantoea ananatis* 相似度为 99%。

表 6. 5 株有机磷降解菌的促生特性和促生效果的相关性分析

Table 6. Correlation analysis of growth promoting characteristics and promoting effects of 5 strains organophosphate-degradation bacteria

Treatment		Stem height	Root height	Plant height	Stem fresh weight	Root fresh weight	Plant fresh weight	Stem dry weight	Root dry weight	Plant dry weight
OP	Pearson correlation	0.826	0.854	0.843	0.737	-0.668	0.696	0.724	-0.790	0.701
	Significance (bilateral)	0.085	0.066	0.073	0.156	0.217	0.191	0.166	0.112	0.187
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
IP	Pearson correlation	-0.681	-0.675	-0.686	-0.551	0.730	-0.496	-0.571	0.831	-0.558
	Significance (bilateral)	0.206	0.211	0.201	0.335	0.161	0.395	0.315	0.081	0.329
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
IAA	Pearson correlation	-0.906*	-0.946*	-0.927*	-0.734	0.686	-0.695	-0.612	0.707	-0.522
	Significance (bilateral)	0.034	0.015	0.023	0.158	0.201	0.193	0.272	0.182	.0367
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5
SI	Pearson correlation	-0.463	-0.439	-0.461	-0.512	0.031	-0.534	-0.406	0.022	-0.345
	Significance (bilateral)	0.432	0.460	0.434	0.378	0.960	0.354	0.497	0.972	0.570
	N	5	5	5	5	5	5	5	5	5

OP: organophosphate-degradation capacity; IP: inorganic phosphorus-solubilizing capacity; IAA: IAA production capacity; SI: siderophores production capacity.

表 7. 有机磷降解菌 16S rRNA 的测序结果

Table 7. 16S rRNA sequence of organophosphate-degradation bacteria

Strains	Results	Coverage/ %	Similarity/ %
G1-8	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	100
G1-13	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	100
G1-18	<i>Cedecea neteri</i>	100	99
G3-6	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	100
G3-26	<i>Pantoea ananatis</i>	99	99

3 讨论

有机磷降解菌在环境中广泛存在。目前对于有机磷降解细菌的研究主要集中于土壤，并认为根际土壤中微生物的解磷菌数量高于非根际土壤^[14]。植物内生有机磷降解细菌的报道较少，目前可从春兰根内可筛选到内生有机磷降解菌^[15]。本研究从草坪根系内部、草坪根际土壤、湖水样品中均未筛选到具有稳定有机磷降解能力的微生物，但是从草坪根周土壤中筛选到大量具有稳定

有机磷降解能力的微生物。解磷菌在土壤中的数量及生态分布，受有机磷化肥农药的添加、土壤质地、有机质含量、土壤类型和耕作栽培方式等的影响^[1,9]。目前筛选到的有机磷降解菌有机磷降解能力差异较大，韩玉竹等^[16]筛选到有机磷降解菌 B3 培养 3 d 后 HD/CD 最大为 16.4；郑世忠等^[1-3]筛选到的巨大芽孢杆菌，培养 7 d 后 HD/CD 最大为 5.66；白文娟等^[17]筛选到的有机磷降解细菌培养 7 d 后溶磷圈 HD/CD 最大为 4.80；而本研究筛选到 G1-13 和 G3-6 培养 7 d 后的解磷圈 HD/CD 比值为 3.28，说明解磷效果处于中等水平。

对于有机磷降解细菌种类的研究，国内外已有很多相关的报道，多为芽孢杆菌和假单胞菌。林启美等^[9]对农田(小麦-玉米)、草坪(羊茅)、林地(榆树)和菜地(花椰菜等)根际土壤解磷微生物数量和种群结构研究时，发现有机磷降解细菌主要是芽孢杆菌属，其次是假单胞菌属。本研究筛选的有机磷降解菌有假单胞菌属、嗜麦芽窄食单胞

菌属、奈氏西地西菌属和菠萝泛菌属等。

有机磷降解菌具有将土壤中难溶性的磷溶解为植物可吸收利用的有效磷的生物学特性, 不仅能提高土壤中有效磷含量, 促进植物对磷的吸收利用, 而且能通过固氮、分泌 IAA、铁载体等促进植物的生长, 目前已成为农业生产实践中重点研究方向。王亚艺等^[18]在盆栽实验中发现与 CK 相比, 有机磷降解菌 y9-4 处理的小油菜的产量提高 95.3%。胡晓峰等^[19]筛选的菌株 P1 和 P3 兼具溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、磷矿粉、卵磷脂和拮抗土传病原菌的功能, 在盆栽试验中与对照比较, 促进玉米生长, 株高、叶长、叶宽和干重分别增加 5.1%–33.8% 和 17.7%–37.6%。朱斌等^[20]筛选出 4 株可同时利用 $\text{Ga}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 AlPO_4 、 FePO_4 和卵磷脂的溶磷菌株(P1、P17、P35 和 P21), 4 株溶磷菌均能显著提高玉米幼苗干物质质量(61.4%–113.0%)、可溶性糖和可溶性蛋白质量分数及根系活力。本研究首次筛选到了能显著促进黄瓜生长的有机磷降解菌。其中筛选到的有机磷降解菌 G3-6 与空白对照相比, 可提高黄瓜苗鲜重 71.53%、干重 69.78% 和株高 33.55%, 与阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 相比, 可提高黄瓜苗鲜重 2.52%、干重 21.14% 和株高 8.27%, 其促生效果显著优于常用促生菌枯草芽孢杆菌。

有机磷降解菌的促生特性具有多样性。李蓉等^[21]筛选的 12 株有机磷降解菌中有 7 株具有分泌 IAA 的功能。徐爱芳等^[15]筛选到 13 株春兰根内生有机磷降解菌, 且大部分为芽孢杆菌属, 芽孢杆菌属的细菌作为一类重要的植物促生细菌, 具有诱导系统抗性、解磷、分泌 IAA 和分泌铁载体等多种功能, 其中内生有机磷降解菌菌株 N85 归属于伯克氏菌属, 它不仅具有较强的有机磷降解能力, 而且具有较高的产铁载体能力。本研究

筛选到的 35 株有机磷降解菌中, 同时具有解无机磷、固氮、分泌 IAA 和铁载体能力的菌株有 7 株; 同时具有解无机磷、分泌 IAA 和铁载体的菌株有 1 株; 同时具有固氮、分泌 IAA 和铁载体的菌株有 3 株; 同时具有分泌 IAA 和铁载体的菌株有 21 株; 同时具有固氮和分泌 IAA 的菌株有 2 株; 同时具有解无机磷和分泌 IAA 的菌株有 1 株。有机磷降解菌促生特性多样性, 可能使其对植物的促生作用加强。

通过对 5 株代表性有机磷降解菌促生特性和促生效果的相关性分析, 发现有机磷降解能力(OP)可明显促生黄瓜生长, 而吲哚乙酸(IAA)、解无机磷能力(IP)、分泌铁载体的能力(SI)均对黄瓜苗的生长有一定的抑制作用。因此我们推测有机磷降解菌可能主要是通过有机磷降解能力(OP)促进黄瓜苗生长。有机磷降解能力(OP)促进植物生长的研究已有很多报道, 其原理是解有机磷菌通过分泌磷酸酶、植酸酶和核酸酶等有机磷降解酶将土壤中难溶性有机磷分解为可溶性的小分子, 为植物提供更多的磷源, 从而促进植物生长发育^[22]。吲哚乙酸(IAA)、解无机磷的能力(IP)和分泌铁载体的能力(SI)对植物促生作用的报道也有很多, 作用机理也较为明晰^[23–24]。但是这些促生特性在土壤这个复杂的生态系统中是否发挥作用会受到很多生物和非生物因素的影响。研究表明吲哚乙酸(IAA)对植物的促生作用会受到浓度的影响, IAA 浓度过高反而抑制植物生长^[23]; Asea 等^[25]发现一些解磷菌只有在介质中有 NH_4^+ 存在时, 才具有溶解无机磷酸盐的能力; 胡青平等^[26]研究金属离子对有机磷降解菌 PSB-2 解磷能力的影响中, 发现 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 和 Mn^{2+} 可以促进解磷能力的提高。因此, 要深入了解解有机磷菌的促生机制, 还有待于进一步的研究。

本研究的结果表明有机磷降解能力在促进植物生长过程中可能发挥着比其他功能更重要的作用,但是有机磷降解菌在田间的大规模应用和工业化生产还鲜有报道。为了实现有机磷降解菌的大规模应用和商业化生产,其在土壤中的定殖能力、生态变化、促生机制和解磷机理等还需进行更深入的研究。

4 结论

本研究通过平板初筛和复筛从草坪根周土壤中筛选到 35 株有机磷降解菌,其中 G1-13 和 G3-6 的 HD/CD 值最大,为 3.28。有机磷降解菌 G3-6 在盆栽实验中对黄瓜苗有较好的促生效果,与空白对照相比,可提高黄瓜苗鲜重 71.53%、干重 69.78%和株高 33.55%,与阳性对照枯草芽孢杆菌 F-H-1 相比,可提高黄瓜苗鲜重 2.52%、干重 21.14%和株高 8.27%。G3-6 除具有有机磷降解的作用,还有分泌 IAA 和铁载体的能力,是 1 株潜在的具有广阔市场应用价值的高效有机磷降解菌。

参考文献

- [1] Zheng SZ, Jiang ST, Huang YX, Shen JB. Isolation and screening of organophosphate-dissolving bacterium and its identification in soil. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2009, 15(15): 24–26. (in Chinese)
郑世仲, 江胜滔, 黄燕翔, 沈嘉彬. 土壤中有机磷解磷细菌的分离筛选及鉴定. *安徽农学通报*, 2009, 15(15): 24–26.
- [2] Wang KP, Zheng Y, Chu GY, Niu DD. Screening of bacterial strains for phosphate solubilization, nitrogen fixation and IAA production and their promotive effects on plant growth. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2013, 29(6): 1352–1359. (in Chinese)
王奎萍, 郑颖, 褚光耀, 牛冬冬. 解磷、固氮、产吲哚乙酸微生物菌株的筛选及其对植物的促生效果. *江苏农业学报*, 2013, 29(6): 1352–1359.
- [3] Attaway H, Nelson JO, Baya AM, Voll MJ, White WE, Grimes DJ, Colwell RR. Bacterial detoxification of diisopropyl fluorophosphate. *Applied & Environmental Microbiology*, 1987, 53(7): 1685–1689.
- [4] Kaneva I, Mulchandani A, Chen W. Factors influencing parathion degradation by recombinant *Escherichia coli* with surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(2): 275–278.
- [5] Wang JW, Zhen J, Xie BE, Liu YY, Li GJ. Isolation and screening of organic phosphorus-solubilizing bacterium and its initial identification. *He'nan Science*, 2011, 29(1): 31–34. (in Chinese)
王继雯, 甄静, 谢宝恩, 刘莹莹, 李冠杰. 有机磷降解菌的分离筛选及初步鉴定. *河南科学*, 2011, 29(1): 31–34.
- [6] Ge YH, Chen LJ, Wang L, Su HY, Zhou JF, Cheng XH. Effects of insertional inactivation of *gacS* gene on two secondary metabolites in *Pseudomonas chlororaphis* G-05. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(12): 1595–1601. (in Chinese)
葛宜和, 陈丽娟, 王磊, 宿红艳, 周金凤, 程显好. *gacS* 基因插入失活对绿针假单胞菌 G-05 的两种胞外次生代谢物合成的影响. *微生物学报*, 2008, 48(12): 1595–1601.
- [7] Yin TT, Wang JJ, Liu Y, Liang YJ, Wang XB, Han YF, Wang X, Cheng MJ, Huang ZY. The screening of efficient phosphorus-solubilizing bacteria and the primary study on its mechanism of plant-growth-promoting. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(12): 234–242. (in Chinese)
银婷婷, 王敬敬, 柳影, 梁亚杰, 王兴彪, 韩一凡, 王夏, 程美娟, 黄志勇. 高效解磷菌的筛选及其促生机制的初步研究. *生物技术通报*, 2015, 31(12): 234–242.
- [8] Fan BQ, Jin JY, Ge C. Isolation of penicillium oxalicum and its effect on solubilization of insoluble phosphate under different conditions. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(5): 525–530. (in Chinese)
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. *中国农业科学*, 2002, 35(5): 525–530.
- [9] Lin QM, Zhao XR, Sun YX, Yao J. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems. *Soil and Environmental Sciences*, 2000, 9(1): 34–37. (in Chinese)
林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 姚军. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布. *土壤与环境*, 2000, 9(1): 34–37.
- [10] Ji YL. Characteristics of dissolving phosphate and secreting IAA of rhizobia in *Robinia pseudoacacia*. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2014, 26(6): 34–37, 41. (in Chinese)
冀玉良. 刺槐根瘤菌溶磷和分泌植物生长素特性的研究. *江西农业学报*, 2014, 26(6): 34–37, 41.
- [11] Zhou DM, Li R. Screening of nitrogen-fixing bacteria in rhizosphere of *Cunninghaimia lanceolata* and investigation on their properties of phosphate-solubilizing and IAA-producing. *Journal of Sichuan Normal University (Natural Science)*, 2012, 35(4): 562–566. (in Chinese)
周德明, 李蓉. 杉木根际固氮菌筛选及其溶磷性与分泌

- IAA 特性研究. 四川师范大学学报(自然科学版), 2012, 35(4): 562–566.
- [12] Zhang Y, Zhu Y, Yao T. Characteristics of phosphate dissolving and IAA secretion of phosphorus-solubilizing bacteria isolated from *Trifolium. Grassland and Turf*, 2012, 32(5): 36–40. (in Chinese)
张英, 朱颖, 姚拓. 三叶草根际溶磷菌溶磷及分泌 IAA 能力测定. 草原与草坪, 2012, 32(5): 36–40.
- [13] Wang Y, Yu XM, Zheng FC. Screening of phosphate solubilizing bacterias (PSB 26) from the tropical soils and the study of its antagonism. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2009, 15(7): 59–62. (in Chinese)
王义, 余贤美, 郑服丛. 热带土壤解磷细菌 PSB26 的筛选鉴定及拮抗初探. 安徽农学通报, 2009, 15(7): 59–62.
- [14] Shi H, Zhu YJ, Li F, Liu B. Polysaccharides of *Paecilomyces lilacinus* strain NH-PL-03 and inhibitory effects to *Fusarium oxysporum*. *China Plant Protection*, 2006, 26(9): 5–8. (in Chinese)
史怀, 朱育菁, 李芳, 刘波. 淡紫拟青霉 NH-PL-03 菌株的多糖及其对尖孢镰刀菌的抑制作用. 中国植保导刊, 2006, 26(9): 5–8.
- [15] Xu AF, Wu YX, Liu Y. Screening of organic phosphate solubilizing entophytic bacteria of *Cymbidium goeringii* roots. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2013, 41(4): 1515–1516, 1529. (in Chinese)
徐爱芳, 武永秀, 刘莹. 春兰根内生解有机磷细菌的筛选. 安徽农业科学, 2013, 41(4): 1515–1516, 1529.
- [16] Han YZ, Zhao JJ, Zeng B, Ming XY, Zhu QW. Isolation and the phosphate solubilizing capacity of Italian Ryegrass rhizosphere phosphate-solubilizing microorganism. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(5): 766–770. (in Chinese)
韩玉竹, 赵建军, 曾兵, 明晓燕, 朱全伟. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定. 草地学报, 2011, 19(5): 766–770.
- [17] Bai WJ, Hu RR, Zhang JE, Feng LF, Xu HQ. A study on the isolation, screening and phosphate solubilizing capacity of phosphate solubilizing bacteria in the rhizosphere of corn. *Journal of South China Agricultural University*, 2013, 34(2): 167–176. (in Chinese)
白文娟, 胡蓉蓉, 章家恩, 冯丽芳, 徐华勤. 玉米根际溶磷细菌的分离、筛选及溶磷能力研究. 华南农业大学学报, 2013, 34(2): 167–176.
- [18] Wang YY. Effect of P solubilizing bacteria on rape yield and the content of soil phosphorus. *Northern Horticulture*, 2014, (5): 155–158. (in Chinese)
王亚艺. 使用解磷细菌对小油菜产量及土壤磷含量的影响. 北方园艺, 2014, (5): 155–158.
- [19] Hu XF. Screening of phosphate solubilizing bacteria, optimization of phosphate dissolving conditions and its promotion to maize growth. Master Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2010. (in Chinese)
胡晓峰. 溶磷菌的筛选、溶磷条件优化及对玉米的促生作用研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
- [20] Zhu B, Huang AY, Cai YL, Yan ZC, Mu ZJ. Screening of phosphate-dissolving bacteria capable of dissolving various insoluble phosphates and their effects on maize seedlings growth. *Journal of Southwestern University (Natural Science Edition)*, 2013, 35(9): 11–16. (in Chinese)
朱斌, 黄爱纛, 蔡一林, 严智超, 木志坚. 兼溶多种难溶磷的溶磷菌筛选及其对玉米幼苗生长的影响. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(9): 11–16.
- [21] Li R, Zhou DM, Wu Y, Zhou GY, Huang PF, Deng XJ. Selection and characteristics of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Cunninghamia lanceolata*. *Journal of Central South University of Forestry and Technology*, 2012, 32(4): 95–99. (in Chinese)
李蓉, 周德明, 吴毅, 周国英, 黄鹏飞, 邓小军. 杉木根际溶磷菌筛选及其部分特性的初步研究. 中南林业科技大学学报, 2012, 32(4): 95–99.
- [22] Jin SC, Du CM, Ping WX, Guan HY, Xu BY. Advance in phosphorus-dissolving microbes. *Journal of Microbiology*, 2006, 26(2): 73–78. (in Chinese)
金术超, 杜春梅, 平文祥, 关洪宇, 徐宝兴. 解磷微生物的研究进展. 微生物学杂志, 2006, 26(2): 73–78.
- [23] Mo YW, Li XJ, Wang H, Chen ZK, Yang G, Wang W. Effect of auxin treatment on root hair formation and aquaporins genes expression in root hair of rice. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(21): 4227–4239. (in Chinese)
莫亿伟, 李夏杰, 王海, 陈泽恺, 杨国, 王尉. IAA 对水稻根毛形成与水通道蛋白基因表达关系的研究. 中国农业科学, 2015, 48(21): 4227–4239.
- [24] Wang LJ. Screening of phosphate solubilizing bacteria and its effects on the growth of wheat. Master Dissertation of Dalian University of Technology, 2008. (in Chinese)
王莉晶. 高效解磷菌的筛选及其对小麦生长的影响. 大连理工大学硕士学位论文, 2008.
- [25] Asea PEA, Kucey RM, Sterart JWB. Inorganic phosphate solubilization by two penicillium species in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20(4): 459–464.
- [26] Hu QP, Xu JG. Study on phosphate-dissolving ability of organic phosphate bacterium PSB-2. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2012, 12(1): 71–74. (in Chinese)
胡青平, 徐建国. 有机磷细菌 PSB-2 的解磷能力初探. 中国食品学报, 2012, 12(1): 71–74.

Screening and growth promoting characteristics of efficient organophosphate-degradation bacteria

Huan Wang^{1,2}, Jingjing Wang², Song Xu², Wei Zhao², Yifan Han², Xingbiao Wang², Zhiyong Huang^{2*}

¹ College of Biology Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

² Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

Abstract: [Objective] Our aim is to screen efficient organophosphate-degradation bacteria from environment and study their growth promoting mechanism. [Methods] We screened organophosphate-degradation bacteria from environment using selective medium, and studied the promoting growth characteristics by biochemical assays, then screened organophosphate-degradation and plant-growth-promoting bacteria by pot experiment. [Results] In total 35 strains of organophosphate-degradation bacteria were isolated from bulk soil of grass by Mengjinna organophosphate-degradation medium. The promoting growth characteristics of these bacteria were checked by biochemical methods. Five representative strains were selected for cucumber seedlings pot experiment. Strain G3-6 had the strongest ability to solubilize organic phosphorus, the ratio of hydrolysis circle diameter (HD) and colony diameter (CD) was 3.28. Strain G3-6 had the highest ability to promote cucumber growth than other strains. Compared with the control, G3-6 increased fresh weight, dry weight and height of cucumber seedlings by 71.53%, 69.78% and 33.55%, respectively. Compared with the positive control *Bacillus subtilis* F-H-1, G3-6 increased fresh weight, dry weight and height of cucumber seedlings by 2.52%, 21.14% and 8.27%, respectively. The results of correlation analysis showed that the ability of organophosphate-degradation might play a more important role in promoting cucumber growth than other functions. Strain G3-6 was identified as *Pseudomonas* sp. by 16S rRNA analysis. [Conclusion] *Pseudomonas* sp. G3-6 has strong ability of degrading organic phosphate, and can strongly promote cucumber growth. This strain would be a potential growth promoting bacterium.

Keywords: organophosphate-degradation bacteria, screening, growth promoting mechanism, cucumber

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31500424), by the Science and Technology Service Network Initiative (KFJ-SW-STS-143-6), by the Open Fund of Zhejiang Provincial Top Key Discipline of Aquaculture in Ningbo University (xkzsc10) and by the Scientific Research Foundation for the Returned Overseas Chinese Scholars, Tianjin (2016019)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-22-84861931; E-mail: huang_zy@tib.cas.cn

Received: 5 September 2016; Revised: 28 October 2016; Published online: 8 December 2016