

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.04.032

引用格式:杨维,马振林,闫刚,等.药用植物卷叶黄精根际解磷细菌的筛选鉴定及培养条件的优化[J].草地学报,2026,34(4):1510–1523

YANG Wei, MA Zhen-lin, YAN Gang, et al. Screening, Identification and Optimization of Culture Conditions of Phosphate-Solubilizing Bacteria in the Rhizosphere of Medicinal Plant *Polygonatum cirrhifolium*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(4):1510–1523

药用植物卷叶黄精根际解磷细菌的筛选鉴定 及培养条件的优化

杨维^{1,2,3,4}, 马振林^{1,2,3,4}, 闫刚^{1,2,3,4}, 王泽^{1,2,3,4}, 岳辰^{1,2,3,4}, 刘航^{1,2,3,4},
王瑞红^{1,2,3,4}, 张新军^{1,2,3,4*}

(1. 西藏农牧大学高原生态研究所, 西藏 林芝 860000; 2. 青藏高原森林生态教育部重点实验室, 西藏 林芝 860000; 3. 西藏林芝高山森林生态系统国家野外科学观测研究站, 西藏 林芝 860000; 4. 西藏自治区高寒植被生态安全重点实验室, 西藏 林芝 860000)

摘要: 解决土壤磷缺失现状, 开发新型、安全、高效的微生物菌肥。本研究以西藏卷叶黄精(*Polygonatum cirrhifolium*)为试验材料, 采用“划线法”筛选具有解磷能力的菌株, 测定其解磷能力, 并对其培养条件进行研究。结果显示, 本研究共分离获得9株解磷细菌, 筛选到5株溶磷指数 >2.0 的解磷菌株, 解磷量为 $29.603\sim41.730\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; 鉴定菌株JYHJ-1为*Pseudomonas yamanorum*, JYHJ-2为*Pseudomonas koreensis*, JYHJ-3为*Serratia proteamaculans*, JYHJ-4为*Pseudomonas azotoformans*, JYHJ-5为*Microbacterium oxydans*。菌株JYHJ-3的解磷能力最强, 且可分泌7种有机酸和具产铁载体、解钾、固氮及产吡啶乙酸等能力。单因素试验中, 碳源以乳糖、氮源以乙酸铵、初始pH值为5.5、接种量2%、NaCl浓度1%时菌株解磷效果最优。在单因素试验基础上, 采用响应面试验对初始pH值、接种量、NaCl浓度进行优化, 最终确定最佳培养条件为: 乳糖为碳源、乙酸铵为氮源、初始pH值为5.5、接种量为3%、NaCl为1%。综上, 卷叶黄精根际解磷细菌资源丰富, 可为药用卷叶黄精可持续栽培及微生物肥料开发提供菌株资源与理论依据。

关键词: 卷叶黄精; 根际细菌; 解磷能力; 培养条件

中图分类号: S567.239

文献标识码: A

文章编号: 1007-0435(2026)04-1510-14

Screening, Identification and Optimization of Culture Conditions of Phosphate-Solubilizing Bacteria in the Rhizosphere of Medicinal Plant *Polygonatum cirrhifolium*

YANG Wei^{1,2,3,4}, MA Zhen-lin^{1,2,3,4}, YAN Gang^{1,2,3,4}, WANG Ze^{1,2,3,4}, YUE Chen^{1,2,3,4}, LIU Hang^{1,2,3,4},
WANG Rui-hong^{1,2,3,4}, ZHANG Xin-jun^{1,2,3,4*}

(1. Institute of Xizang Plateau Ecology, Xizang Agriculture and Animal Husbandry University, Linzhi, Xizang 860000, China; 2. Key Laboratory of Forest Ecology of Xizang Plateau, Ministry of Education, Linzhi, Xizang 860000, China; 3. National Forest Ecosystem Observation & Research Station of Linzhi XiZang, Linzhi, Xizang 860000, China; 4. Key Laboratory of Alpine Vegetation Ecological Security in Xizang, Linzhi, Xizang 860000, China)

Abstract: To address the current status of soil phosphorus deficiency, this study aimed to develop novel, safe,

收稿日期: 2025-06-11; 修回日期: 2025-08-25

基金项目: 西藏自治区科技计划项目(XZ202301ZR0047G, XZ202301YD0028C); 国家自然科学基金(31960013); 西藏农牧学院研究生教育创新计划项目(YJS2021-22); 西藏农牧大学研究生教育创新计划项目(YJS-202443); 2024年度青藏高原森林生态教育部重点实验室研究生创新计划项目(XZAJYBSYS-202409, XZAJYBSYS-08)资助

作者简介: 杨维(1999-), 女, 土家族, 贵州铜仁人, 硕士研究生, 主要从事微生物的研究, E-mail: 3679030032@qq.com; *通信作者 Author for correspondence, E-mail: zxjun_126abc@126.com

and efficient microbial fertilizers. *Polygonatum cirrhifolium* from Tibet was used as the test material, and the streak plate method was employed to isolate and screen phosphorus-solubilizing strains. Their phosphorus-solubilizing capacity was determined, and the culture conditions were investigated. The results showed that a total of 9 phosphorus-solubilizing bacterial strains were isolated. Among them, 5 strains with a phosphate solubilization index (PSI) > 2.0 were screened, with phosphorus-solubilizing capacities ranging from 29.603 to 41.730 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The strains were identified as follows: JYHJ-1 as *Pseudomonas yamanorum*, JYHJ-2 as *Pseudomonas koreensis*, JYHJ-3 as *Serratia proteamaculans*, JYHJ-4 as *Pseudomonas azotoformans*, and JYHJ-5 as *Microbacterium oxydans*. Strain JYHJ-3 exhibited the strongest phosphorus-solubilizing ability, and it could secrete 7 types of organic acids as well as possess capabilities such as siderophore production, potassium solubilization, nitrogen fixation, and indole-3-acetic acid (IAA) production. In the single-factor experiments, the optimal phosphorus-solubilizing efficiency was achieved when lactose was used as the carbon source, ammonium acetate as the nitrogen source, initial pH was 5.5, inoculation volume was 2%, and NaCl concentration was 1%. Based on the single-factor experiments, response surface methodology (RSM) was applied to optimize the initial pH, inoculation volume, and NaCl concentration. The final optimal culture conditions were determined as follows: lactose as the carbon source, ammonium acetate as the nitrogen source, initial pH 5.5, inoculation volume 3%, and NaCl concentration 1%. In conclusion, the rhizosphere of *Polygonatum cirrhifolium* was rich in phosphorus-solubilizing bacterial resources. This study provided strain resources and a theoretical basis for the sustainable cultivation of medicinal *Polygonatum cirrhifolium* and the development of microbial fertilizers.

Key words: *Polygonatum cirrhifolium*; Rhizosphere bacteria; Phosphate-solubilizing capacity; Fermentation conditions

磷是植物生长发育不可或缺的关键营养元素,参与光合作用、能量代谢、细胞分裂等重要生理过程^[1],其有效性直接制约着生态系统生产力与农业可持续发展。然而,土壤中95%以上的磷以难溶性无机磷(如磷酸钙、磷酸铝)或有机磷(如卵磷脂、植酸)形式存在,难以被植物直接吸收利用^[2-3]。藏东南色季拉山土壤总磷含量因母岩风化作用维持在中等水平($0.8 \sim 1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),但受酸性土壤环境影响,磷素易与铁、铝离子结合形成稳定的磷酸铁铝复合物,同时低温环境抑制土壤微生物活性,进一步降低磷的转化效率,导致有效磷含量仅为 $3.2 \sim 8.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,处于极低水平。为了缓解土壤磷素缺乏的问题,人们长期以来大量施用化学磷肥,但化学磷肥的过量使用不仅导致土壤结构破坏、环境污染等一系列生态问题,还增加了农业生产成本。随着可持续农业理念的深入研究,利用微生物的解磷作用来提高土壤磷素利用率,成为当前农业研究的热点方向之一。

解磷微生物作为土壤磷素循环的关键驱动者^[4],可通过酸解、酶解和 NH_4^+ 同化作用等方式将土壤中难溶性磷转化为植物可利用的可溶性磷,对土壤中磷元素的形态和利用率具有重要影响^[5]。同时还能产生植物生长激素、抗生素等物质,促进植物生长并抑制病原菌的繁殖^[6]。解磷微生物可分为细菌、真菌以及放线菌^[7]。迄今为止,国内外研究较

多的解磷菌菌株已有20多个属^[8],其中解磷细菌研究较多,主要以芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、固氮菌(*Azotobacter*)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)、根瘤菌(*Rhizobium*)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)等为主^[9],而报道的解磷真菌较少,主要以曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)等为主^[10]。目前,对解磷细菌的研究主要集中于植物根际、根瘤及各类土壤环境中,其多样性与功能特性随生境差异呈现显著分化。例如,从三个不同农林业区分离并已在盆栽试验条件下筛选过的小麦生长的PSB菌株L3和P2菌株,在低于 20°C 时的磷溶解能力使其成为开发基于嗜冷菌的磷生物肥料的合适候选者。农林业系统中PSB菌株的低温磷溶解能力使其成为冬季作物的潜在生物肥料^[11]。在秸秆生物炭中筛选得到的*Pseudomonas* sp. NK2,在难溶磷源下显著分泌乙酸、草酸、葡萄糖酸、柠檬酸并提升有效磷;与秸秆生物炭联用可增强促生效应,为干旱区菌剂+载体联用提供依据^[12];喜马拉雅高海拔来源的耐冷*Pseudomonas*在 $15 \sim 25^\circ\text{C}$ 稳定溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$,产草酸、苹果酸;接种拟南芥显著促生,证实低温下解磷与促生活性稳定^[13];神府矿区的基尔假单胞菌(*Pseudomonas kilonensis*)能活化煤矸石中的磷素,为矿区生态恢复提供了新途径^[14]。这些研究均表明解磷菌的功能特性与其生存环境密切相关,特殊环境中往往蕴藏着

具有独特抗逆性与高效解磷能力的菌株,但针对高寒环境中药用植物根际解磷细菌的研究较少。因此,生长于高寒环境中的药用植物对于恶劣环境的适应机制是一个值得研究的问题,其根际解磷菌有助于药用植物对磷的吸收利用,这对于药用植物对高寒环境的适应应该能够起到积极作用。

卷叶黄精(*Polygonatum cirrhifolium*)是百合科(Liliaceae)黄精属(*Polygonatum*)多年生草本植物,具有补气养阴、健脾润肺等功效^[15],主要分布于高海拔地区,如西藏色季拉山地区。本研究采用无机磷培养基,从生长于藏东南色季拉山高寒环境中的药用植物卷叶黄精根际土中分离、筛选高效解磷细菌,通过定性和定量分析方法测定菌株的解磷能力,结合生理生化特性和分子生物学方法对高效解磷细菌进行鉴定。在此基础上,优化其培养条件,确定最佳的培养基组成和培养条件,为药用资源的可持续利用及微生物肥料开发提供理论依据与菌株资源。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

色季拉山(94°28′~94°51′ E, 29°21′~30°50′ N)位于西藏林芝巴宜区,属念青唐古拉山脉余脉,是尼洋河与帕隆藏布江分水岭,区域地势西北高、东南低,最高海拔5300 m,山口海拔4728 m,主体为东西走向的高山峡谷地貌。气候受印度洋暖湿气流与高原季风交替影响,呈现显著垂直分异特征:低海拔(<2000 m)为亚热带湿润气候(年均温16~18℃,降水≥1000 mm);海拔(2000~4000 m)属温带至寒温带(年均温5~12℃,降水600~1000 mm);高海拔(>4000 m)地区为高山寒带(年均温<5℃,固态降水为主)。土壤类型随海拔由黄壤(低山)、棕壤(中山)过渡至高山草甸土(亚高山),冷杉林带下发育具有灰化特征的漂灰土。

1.2 试验材料

1.2.1 药用卷叶黄精根际土的采集 2024年8月,从西藏自治区林芝市色季拉山森林生态系统国家定位观测研究站附近(海拔约3800 m)采集药用卷叶黄精根际土壤(图1),设置了3个重复采样点,分别标记为S1-1、S1-2、S1-3。S1-1坐标为(29°38′55.37″N, 94°42′50.36″E), S1-2坐标为(29°

38′53.68″N, 94°42′49.84″E), S1-3坐标为(29°38′52.99″N, 94°42′49.50″E)。采样时选取长势健壮的植株收集根际土,抖去与根系结合松散的土,留下附在根系上的土壤。将卷叶黄精根际土壤样本装入保鲜袋,迅速将样品转运回实验室,用已灭过菌的毛刷轻轻刷落根际表面土壤获得根际土,置于4℃低温保藏备用。

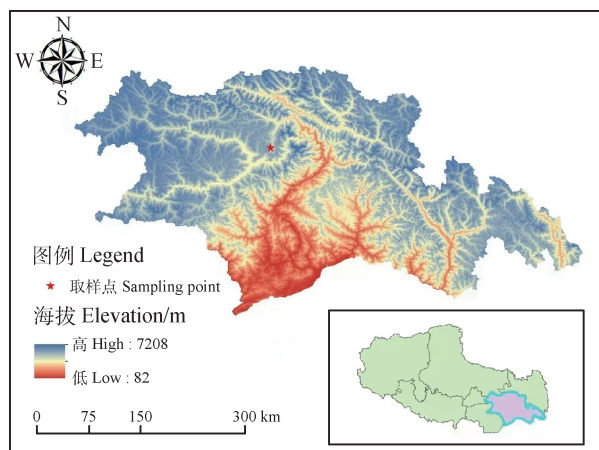


图1 采样位置图

Fig. 1 Sampling location map

1.2.2 所需培养基 LB液体培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaCl 10.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, pH值7.0~7.5。用于菌悬液的制备。

LB固体培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): NaCl 10.0 g, 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母提取物 5.0 g, 琼脂 20 g, pH值7.0~7.5。用于菌株形态的观察。

无机磷液体培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 10.0 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.00 g, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.00 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.10 g, pH值7.00~7.50。用于菌株解磷能力的定量检测。

无机磷固体培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 葡萄糖 10.0 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.00 g, $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.00 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, KCl 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.10 g, 琼脂 20 g, pH值7.00~7.50。用于解磷菌的初筛和定性检测。

硅酸盐培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 钾长石粉 1.00 g, 蔗糖 5.00 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g, Na_2HPO_4 2.00 g, CaCO_3 0.10 g, FeCl_3 0.05 g, 琼脂 20 g, pH值7.00~7.40。用于菌株解钾能力的检测。

Ashby固体培养基($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$): 甘露醇 10.0 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, CaCO_3 5.0 g, 琼脂 20 g, pH值7.0~7.5。用于菌株固氮能力的检测。

CAS蓝色检测液: 60.5 mgCAS溶于50 mL蒸

馏水,10 mL $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ FeCl_3 先溶于HCl后用蒸馏水定容,最后加入40 mL的72.9 mg CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)用蒸馏水配制。

磷酸盐缓冲液($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):磷酸氢二钠24.27 g;磷酸二氢钠5.905 g;磷酸二氢钾0.75 g;氯化铵2.5 g;氯化钠1.25 g,pH值6.8。

CAS检测培养基:每100 mL CAS检测培养基含有1 mL浓度为20%的蔗糖溶液,3 mL浓度为10%的酸水解酪蛋白溶液,100 μL 浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的氯化钙溶液,2 mL的浓度为 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸镁溶液和1.8 g琼脂,将CAS蓝色检测液、磷酸盐缓冲液与该培养基灭菌后,在 50°C 时,每100 mL该培养基分别加入5 mL CAS蓝色检测液和磷酸盐缓冲液。

以上培养基 121°C 灭菌20 min,加有葡萄糖的培养基 115°C 灭菌30 min。固体培养基冷至 50°C 倒平板。

1.2.3 主要仪器设备 电热恒温培养箱(HPX-9162MBE,上海善志仪器设备有限公司),分光光度计(UV-2450),自动高压蒸汽灭菌锅(Tony sx-500,日本Tony公司),pH计(PHS-3E,上海仪电科学仪器股份有限公司),超净工作台(BBS-SDC,济南鑫贝西生物技术有限公司),高速离心机(TG18.6,上海卢湘仪离心机仪器有限公司),电子天平(JA1003,上海舜宇恒平科学仪器有限公司),光学显微镜(AC100V-240V,苏州神鹰光学有限公司),旋涡振荡器(QL-861,江苏省海门市麒麟医用仪器厂),PCR仪(ABI-2720,美国Applied Biosystems公司),电泳仪(Mini Pro 300V Power Supply, major science., USA),电泳槽(Labnet Sub System 70, Labnet Inc., USA),测序仪(ABI 3730XL,美国Applied Biosystems公司),高效液相色谱仪(赛默飞,U3000),超声波清洗机(德意生,040S-2)。

1.3 试验方法

1.3.1 药用卷叶黄精根际解磷细菌的分离筛选 参考李畅等^[16]的试验方法,将根际土过筛处理后,称取1 g根际土放入装有99 mL无菌水的250 mL三角瓶中, 30°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床振荡30 min,然后置于室温静置30 min。吸取上清液即为 10^{-2} 的根际土壤悬液,采用10倍梯度稀释法制得 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 的土壤悬液。吸取100 μL 土壤悬液均匀涂布于无机磷固体培养基,每个梯度3个重复,倒置放入 30°C 的培养箱

中培养。72 h后观察,长出的菌落周围形成透明圈的为解磷菌。挑取解磷菌在无机磷固体培养基平板上划线纯化,得到纯培养,将菌种保存并编号。

1.3.2 药用卷叶黄精根际解磷细菌解磷能力的测定 定性测定:参考李秀彤等^[10]的试验方法,将具有解无机磷特性的菌株接种于LB培养基上活化,培养48 h后刮取菌落制备菌悬液,将菌悬液调整至 $\text{OD}_{600} = 0.6$ 。吸取10 μL 菌悬液分别点接在无机磷固体培养基上,每个菌株3个重复, 30°C 生化培养箱中倒置培养72 h,然后采用“十字交叉法”测定透明圈(D)和菌落的直径(d)^[17],根据D/d值(可溶性指数值)的大小初步确定菌株的解磷能力。

定量测定:参考王莉晶等^[18]的试验方法,吸取1 mL上述活化的菌悬液加入装有30 mL无机磷液体培养基的100 mL三角瓶中,以不接种菌株为空白对照(CK),每个菌株3次重复, 30°C , $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养7 d,取10 mL培养液, $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,采用“钼锑抗比色法”测定各菌株上清液的有效磷含量,测得菌株解无机磷能力,用pH计(PHS-3E)测定上清液pH值。

1.3.3 药用植物卷叶黄精根际解磷细菌的鉴定 菌株形态及生理生化特征:将筛选出的解磷菌用划线法接种到LB固体培养基上, 30°C 培养48 h得单菌落,观察菌落的颜色、形状等特征。革兰氏染色后,使用光学显微镜观察菌体形态^[19]。生理生化试验根据《常见细菌系统鉴定手册》^[20]中有关属、种鉴定的内容和方法,对解磷菌进行革兰氏染色、淀粉水解、甲基红试验、过氧化氢酶反应及明胶试验。

分子生物学鉴定:将所分离的有效解磷菌株寄送至上海派森诺生物科技股份有限公司,采用ABI3730-XL凝胶回收试剂盒进行细菌DNA提取,测16S rDNA的碱基序列。测序完成后,将拼接的序列文件通过NCBI Blast程序,与NCBI 16S数据库中的数据进行序列比对,以此为参比序列构建系统发育树。

1.3.4 药用卷叶黄精根际解磷细菌动态解磷能力及有机酸含量的测定 动态解磷能力的测定:测定方法同1.3.2中的定量测定方法,培养7 d,每天测定一次。

有机酸含量的测定:参考马连杰等^[21]实验方法,准确吸取1.3.2中离心后的上清液1 mL于50 mL离心管中,加入8 mL超纯水,混匀,超声30 min,转移至10 mL容量瓶中,用超纯水定容至刻度线并混

匀,提取液经稀释后过 0.22 μm 滤膜,上机测定。采用赛默飞 U3000 高效液相色谱仪分析有机酸成分,色谱柱采用 LP-C18 色谱柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm),流动相 A 为磷酸二氢钠(pH 2.0),流动相 B 为乙腈,流速 0.8 mL $\cdot$ min $^{-1}$,柱温(35 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$,检测波长 210 nm,进样体积 10 μL 。

1.3.5 药用卷叶黄精根际解磷细菌其他潜在促生能力的测定 采用透明圈法分别对有效解磷菌进行产铁载体能力、解钾能力和固氮能力测定^[22-24]。其中,产铁载体能力、解钾能力和固氮能力测定方法如下:将有效解磷菌分别接种在 CAS 培养基、硅酸盐固体培养基和 Ashby 固体培养基上,每个菌株 4 次重复,30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养,第 5 d 采用“十字交叉法”测定透明圈直径(D)和菌落直径(d),以可溶性指数(D/d)表示菌株产铁载体、解钾和固氮能力。

产吡啶乙酸能力:参考 Chaiarn 等^[25]试验方法;

将有效解磷菌在 LB 培养基上进行活化培养 48 h,然后刮取一个单菌落制备菌悬液。吸取 1 mL OD₆₀₀=0.6 菌悬液分别接种于含有 200 mg $\cdot$ L $^{-1}$ 色氨酸的无机磷液体培养基中,30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r $\cdot$ min $^{-1}$ 摇床中培养 7 d,取 10 mL 培养液,于 4000 r $\cdot$ min $^{-1}$ 离心 20 min,将离心后的上清液与 Salkowski 比色液等体积混合,避光反应 30 min 后测定其在 540 nm 处的吸光值,按照标准曲线得出 IAA 含量。

1.3.6 药用卷叶黄精根际解磷细菌的培养条件优化 单因素试验:以无机磷液体培养基为基础,分别对碳源、氮源、初始酸碱度、菌液接种量及 NaCl 浓度采用单因素试验进行优化,详见表 1。吸取 1 mL OD₆₀₀=0.6 的菌液到装有 50 mL 无机磷液体培养基的 250 mL 的三角瓶中,每个处理 3 个重复,在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r $\cdot$ min $^{-1}$ 的摇床中摇 7 d,7 d 后测定解磷量,从而确定最佳的碳源、氮源、初始酸碱度、菌液接种量及 NaCl 浓度。

表 1 单因素试验条件优化

Table 1 Optimization of single factor test condition

梯度 Grads.	碳源 Carbon source	氮源 Nitrogen source	初始酸碱度 Initial acidity-alkalinity	接种量 Inoculum concentration/%	NaCl/%
1	葡萄糖 Glucose	硝酸钠 Sodium nitrate	5.0	2	0
2	蔗糖 Sucrose	氯化铵 Ammonium chloride	5.5	3	1
3	果糖 Fructose	乙酸铵 Ammonium acetate	6.0	4	2
4	乳糖 Lactose	硝酸钾 Potassium nitrate	6.5	5	3
5	可溶性淀粉 Soluble starch	硫酸铵 Ammonium sulfate	7.0	6	4
6			7.5		5

响应面试验:根据单因素试验,利用 Design-Expert13.0 软件中 Box-Behnken Design 方法对 pH 值、接种量、NaCl 进行优化。利用优化后的培养基配方进行验证实验,重复 3 次。

1.4 数据分析

利用 Excel2019 整理数据,使用 SPSS28.0 进行数据分析,对不同菌株的液体培养基中有效磷含量、有机酸含量的测定以及培养条件的优化进行单因素方差分析和 LSD 法多重比较($P<0.05$)。采用 origin2021 统计软件绘制解磷菌解磷能力的柱状图,使用 Design-Expert13.0 软件绘制响应面图,使用 MEGA11 软件中邻接法(Neighbor-Joining-method)构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 药用植物卷叶黄精根际解磷细菌的组成

从药用植物卷叶黄精根际土壤中分离出 9 株解

磷细菌,为 3 门 6 属,详见表 2。其中变形菌门(Pseudomonas)的假单胞菌属(*Pseudomonas*)分离率占比最高,为 44.44%(4 株);变形菌门的沙雷氏菌属(*Serratia*)、副伯克霍尔德菌属(*Paraburkholderia*)、鞘脂菌属(*Sphingobium*)和放线菌门(Actinobacteria)的微杆菌属(*Microbacterium*),以及厚壁菌门(Bacillota)的葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的占比率均为 11.11%(各 1 株)。

表 2 解磷细菌的组成

Table 2 Composition of phosphate-solubilizing bacteria

门 Phylum	属 Genus	分离率 Separation rate/%
变形菌门 Pseudomonas	假单胞菌属	44.44
	<i>Pseudomonas</i>	11.11
	沙雷氏菌属 <i>Serratia</i>	11.11
	副伯克霍尔德菌属 <i>Paraburkholderia</i>	11.11
	鞘脂菌属 <i>Sphingobium</i>	
放线菌门 Actinobacteria	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	11.11
厚壁菌门 Bacillota	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i>	11.11

2.2 药用卷叶黄精根际解磷细菌的定性测定

将筛选得到的 9 株解磷菌株接种到 LB 液体培养基中进行培养,培养 24 h 后,吸取 10 μL 接于磷酸钙无机磷固体培养基上,在 30℃ 的培养箱中培养 72 h,观察到其中有 5 株根际解磷细菌的溶磷指数(D/d)均大于 2.0(图 2),其中菌株 JYHJ-3 的溶磷指数最大,为 2.82, JYHJ-4 的溶磷指数最小,为 2.49,菌株 JYHJ-1、JYHJ-5、JYHJ-2 的溶磷指数分别为 2.62、2.71、2.53;用 D/d 来初步判断菌株解磷能力的大小,溶磷指数越大,说明菌株的解磷能力越强。

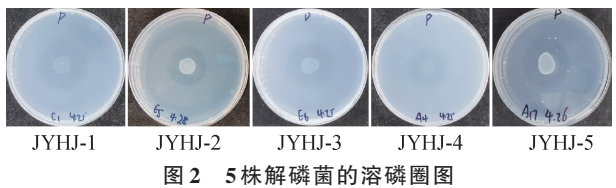


图 2 5 株解磷菌的溶磷圈图

Fig. 2 The phosphate-solubilizing zone diagram of 5 phosphate-solubilizing bacterial strains

注:编号 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 分别代表磷酸钙无机磷培养基上的菌株 C1、E5、E6、A4 和 A17

Note: Codes JYHJ-1, JYHJ-2, JYHJ-3, JYHJ-4, and JYHJ-5 represent strains C1, E5, E6, A4, and A17 on the calcium phosphate inorganic phosphorus medium, respectively

2.3 药用卷叶黄精根际解磷细菌的鉴定

2.3.1 形态学特征及生理生化特征 将溶磷指数大于 2.0 的 5 株高效解磷细菌在 LB 固体培养基上进行划线培养,30℃ 培养箱中培养 24 h,得到了菌株的形态特征(图 3A)。菌株 JYHJGJ-1:米白色,边缘光滑且不凸起,不透明,表面光滑且湿润,黏稠。JYHJ-2:微红色,边缘不光滑且不凸起,不透明,表面光滑且湿润,黏稠;JYHJ-3:粉红色,边缘不光滑

且不凸起,不透明,表面不光滑且湿润,黏稠;JYHJ-4:白色,边缘光滑且不凸起,不透明,表面光滑且湿润,黏稠;JYHJ-5:黄色,边缘光滑且不凸起,不透明,表面光滑且湿润,黏稠。经革兰氏染色分析,鉴定菌株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 为革兰氏阴性杆菌,无芽孢(图 3B)。

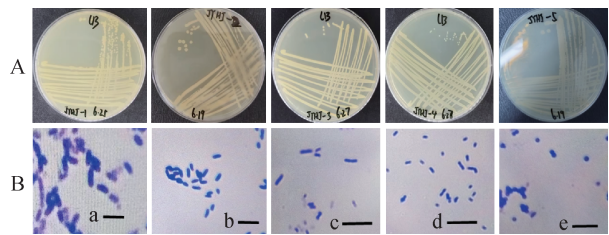


图 3 5 株解磷细菌的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of 5 phosphate-solubilizing bacteria

注:A 为 5 株解磷细菌在 LB 固体培养基上的形态特征;B 为解磷细菌的革兰氏染色结果(1000x),a~e 分别为菌株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5;标尺=10 μm

Note: A shows the morphological characteristics of 5 phosphate-solubilizing bacteria on LB solid medium; B presents the Gram staining results of the phosphate-solubilizing bacteria (1000×), where a-e represent strains JYHJ-1, JYHJ-2, JYHJ-3, JYHJ-4, and JYHJ-5 respectively; scale bar=10 μm

由表 3 可知,菌株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 的过氧化氢反应均呈阳性;菌株 JYHJ-1 和 JYHJ-2 的明胶反应和甲基红试验均呈阳性,淀粉水解反应呈阴性;菌株 JYHJ-3 和 JYHJ-4 的明胶反应和甲基红试验均呈阴性,菌株 JYHJ-3 的淀粉水解反应呈阳性,菌株 JYHJ-4 的淀粉水解反应呈阴性;菌株 JYHJ-5 的明胶反应呈阳性,淀粉水解反应和甲基红试验呈阴性。

表 3 解磷细菌的生理生化特性

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of phosphate-solubilizing bacteria

生理生化特性 Physiological-biochemical characteristic	菌株 Strain				
	JYHJ-1	JYHJ-2	JYHJ-3	JYHJ-4	JYHJ-5
明胶反应 Gelatin reaction	+	+	—	—	+
淀粉水解 Amylohydrolysis	—	—	+	—	—
甲基红试验 Methyl red test	+	+	—	—	—
过氧化氢酶反应 Hydrogen peroxide enzyme reaction	+	+	+	+	+

注: + 代表阳性或有反应, — 代表阴性或没反应

Note: + represents positive or response, and — represents negative or no response

2.3.2 分子生物学特性 将 5 株菌株序列提交至 GenBank 数据库(菌株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 的登录号分别为 PX312812、PX312813、PX312814、PX312815 和 PX312816)进

行 BLAST 分析比对,系统发育树用 MEGA11 软件进行构建(图 4)。结果表明,菌株 JYHJ-1 与雅马纳假单胞菌 *Pseudomonas yamanorum* 同源性最高,其相似度为 99.65%;菌株 JYHJ-2 与韩国假单胞菌

P. koreensis 同源性最高,其相似度为 99.65%;菌株 JYHJ-3 与变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans* 同源性最高,其相似度为 99.45%;菌株 JYHJ-4 与产氮假单胞菌 *P. azotoformans* 同源性最高,其相似度为 99.72%;菌株 JYHJ-5 与氧化微杆菌 *Microbacterium oxydans* 同源性最高,其相似度为 99.79%;综合菌落的形态特征和分子生物学特征,分别将菌株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 鉴定为雅马纳假单胞菌 *P. yamanorum*、韩国假单胞菌 *P. koreensis*、变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans*、产氮假单胞菌 *P. azotoformans* 和氧化微杆菌 *Microbacterium oxydans*。

2.4 药用卷叶黄精根际解磷细菌的定量测定

将 5 株根际解磷细菌接种于 LB 液体培养基中培养 24 h,然后分别吸取 1 mL 菌液于磷酸钙无机磷液体培养基中,在 30℃、180 r·min⁻¹ 的摇床中培养 7 d 后,菌株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 培养液的解磷量均显著高于对照,分别较对照提升了 631.01%、466.86%、698.35%、617.60% 和 612.07%;对照(CK)与 5 株解磷菌株培养液的解磷量差异显著($P < 0.05$),但菌株 JYHJ-1 与 JYHJ-4、JYHJ-5 培养液的解磷量差异不显著(图 5A)。菌

株 JYHJ-1、JYHJ-2、JYHJ-3、JYHJ-4 和 JYHJ-5 的培养液 pH 值显著低于对照,分别比对照下降了 3.53、3.24、3.45、3.26 和 3.62(图 5B);对照(CK)与 5 株解磷菌株培养液的 pH 值差异显著($P < 0.05$),5 株解磷菌株之间差异不显著。由于菌株 JYHJ-3 在定性和定量分析中均表现最佳,故选取菌株 JYHJ-3 进行进一步研究。

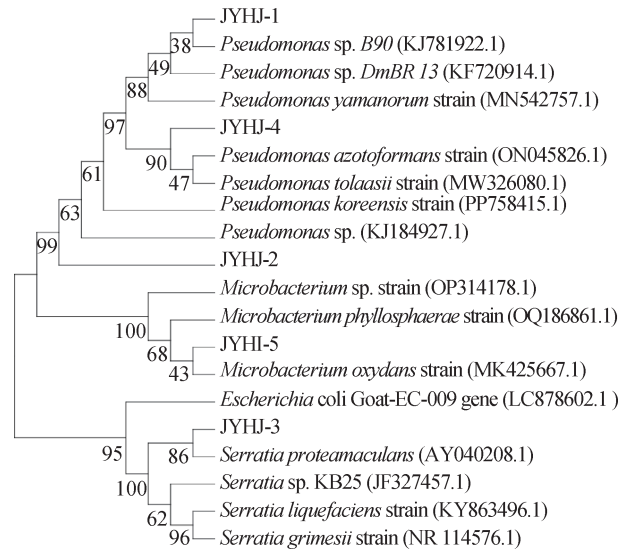


图 4 5 株基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic trees of five strains based on 16rRNA sequences

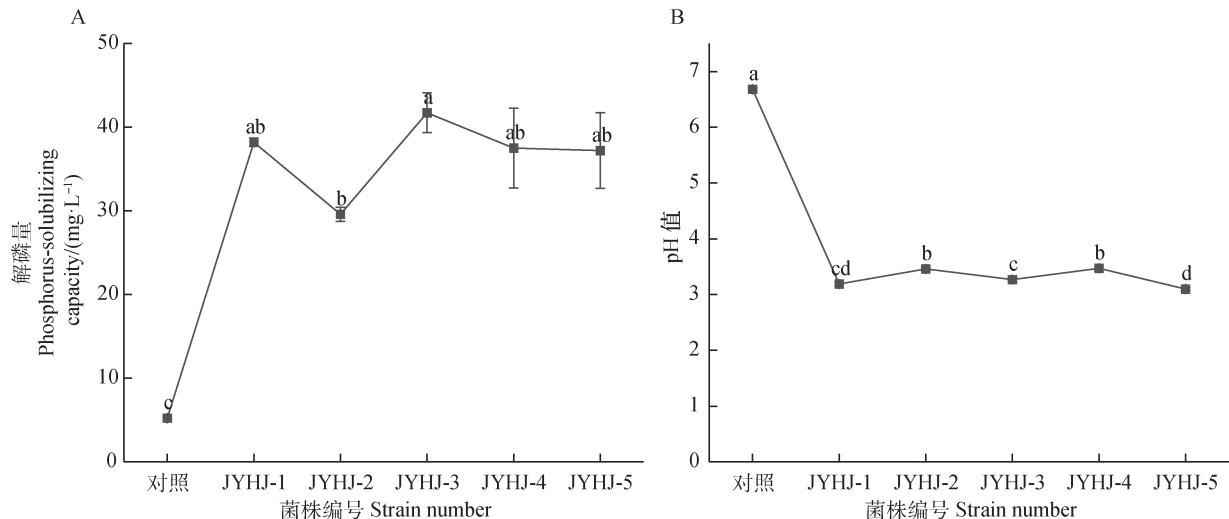


图 5 培养 7d 后培养液的解磷量及 pH 值分析

Fig. 5 Analysis of phosphorus-solubilizing capacity and pH of the culture medium after 7 days of cultivation

注: A、B 分别为培养 7 d 后培养液的解磷量及 pH 值;柱子上不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, Duncan 法),下同

Note: A and B represent the phosphorus-solubilizing capacity and pH of the culture medium after 7 days of cultivation, respectively; Different lowercase letters on the columns indicate significant differences ($P < 0.05$, Duncan), the same as below

2.5 菌株 JYHJ-3 的解磷动态

菌株 JYHJ-3 在磷酸钙无机磷液体培养基中培养 7 d,动态磷含量随着培养天数的增加而呈先升高后降

低的趋势,且动态解磷量之间无差异。菌株 JYHJ-3 在培养第 1 d 时解磷能力最弱,解磷量为 40.272 mg·L⁻¹,较对照提高了 615.82%;在培养第 4 d 时解磷能力最

好,解磷量为 $54.736\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,较对照提高了 660.96% ;在培养的第6~7 d,解磷能力逐渐变弱(图6A)。培养液的pH值随着培养天数的增加呈先下降后升高的趋势,且均显著低于对照,在培养第1 d的培

养液的pH值最大,比对照低 2.87 ;在培养第5 d就下降到最低点 2.86 ,比对照低 3.79 (图6B)。菌株JYHJ-3代谢产酸,但解磷能力与培养液的pH值之间无相关性,产生的非酸类代谢物质是其解磷的主要机制。

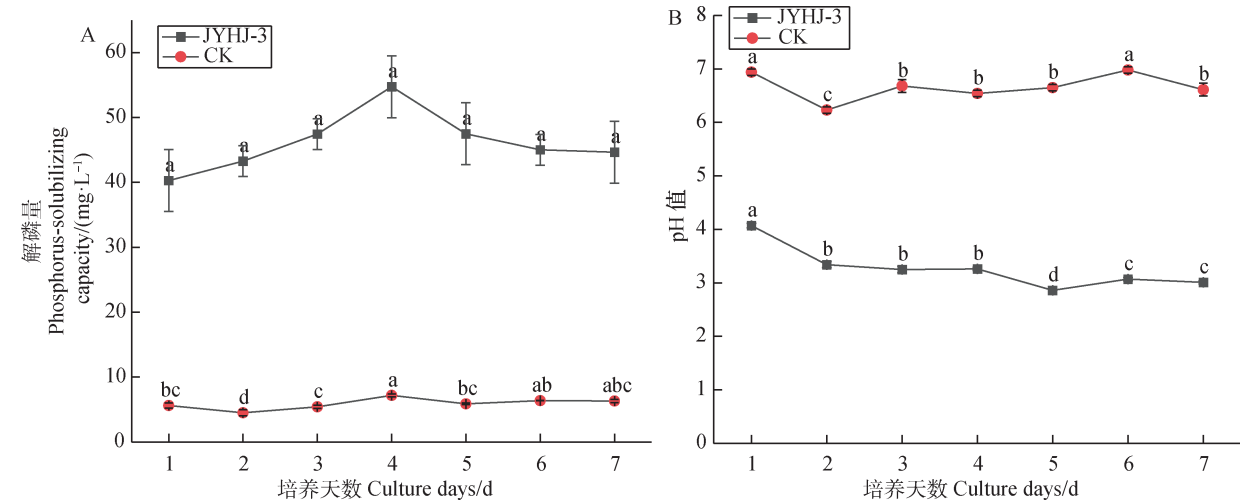


图 6 菌株 JYHJ-3 的解磷动态

Fig. 6 Phosphate-solubilizing dynamics of strain JYHJ-3

注: A 和 B 分别为菌株 JYHJ-3 的动态解磷量及 pH 值

Note: A and B represent the dynamic phosphate-solubilizing capacity and pH of strain JYHJ-3, respectively

2.6 菌株 JYHJ-3 有机酸的测定

根据各种有机酸的标准曲线可以计算出菌株 JYHJ-3 检测到的有机酸的含量(表4)。在 HPLC 检测中发现,解磷细菌 JYHJ-3 可分泌草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、富马酸及丙酸 7 种有机酸(图7)。草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、富马酸

及丙酸的含量分别为 $31.060, 165.200, 161.070, 343.280, 290.970, 0.180, 105.170\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。其中分泌的乳酸含量最多,显著高于其他有机酸含量 ($P<0.05$),菌株 JYHJ-3 分泌酒石酸含量与苹果酸含量差异不显著。而柠檬酸和琥珀酸在菌株 JYHJ-3 中未被检测到。

表 4 标准曲线结果

Table 4 Results of standard curve

序号 Serial number	测定指标 Determination index	标准曲线 Standard curve	决定系数 (R^2) Coefficient of determination (R^2)
1	草酸 Oxalic acid	$y=0.1238x-0.0038$	0.9999
2	酒石酸 Tartaric acid	$y=0.0227x+0.0055$	0.9997
3	苹果酸 Malic acid	$y=0.0131x-0.0002$	0.9998
4	乳酸 Lactic acid	$y=0.0067x+0.004$	0.9998
5	乙酸 Acetic acid	$y=0.0072x+0.0004$	0.9997
6	柠檬酸 Citric acid	$y=0.0138x+0.005$	0.9999
7	琥珀酸 Succinic acid	$y=0.0066x-0.0006$	0.9998
8	富马酸 Fumaric acid	$y=2.7696x-0.0021$	0.9998
9	丙酸 Propionic acid	$y=0.006x-0.0023$	0.9997

2.7 菌株 JYHJ-3 其他潜在促生能力的测定

将菌株 JYHJ-3 接种到 LB 液体培养基中过夜培养 24 h,吸取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 菌液分别点接于 CAS 检测培养基、硅酸盐培养基及 Ashby 固体培养基上,每种培养基 3 个重复,在 30°C 的恒温培养箱中培养 7 d,发现 CAS 检测培养基上具有橙黄色晕圈,显示此菌株

具有产铁载体能力, D/d 为 1.68 ;在硅酸盐培养基及 Ashby 固体培养基上均产透明圈,表明此菌株具有解钾和固氮能力, D/d 分别为 2.46 和 1.21 (图8)。将测出来的吸光值代入 IAA 标准曲线方程 ($y=0.011x-0.0095, R^2=0.9995$),计算出菌株 JYHJ-3 分泌量为 $3.742\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

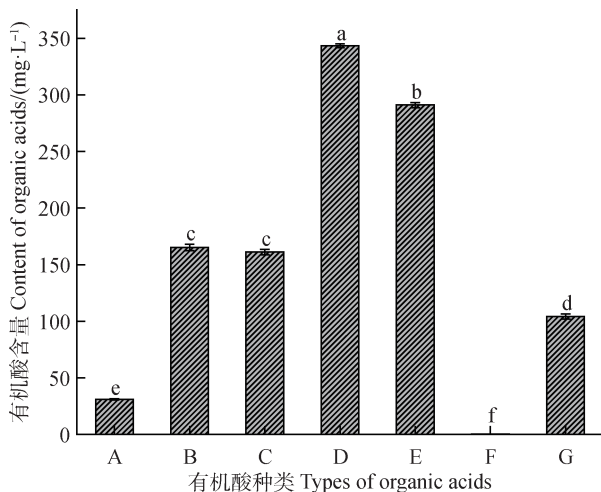


图7 菌株JYHJ-3产有机酸含量的测定

Fig. 7 Determination of organic acid content produced by strain JYHJ-3

注: A、B、C、D、E、F、G 分别代表草酸、酒石酸、苹果酸、乳酸、乙酸、富马酸、丙酸

Note: A, B, C, D, E, F, and G represent oxalic acid, tartaric acid, malic acid, lactic acid, acetic acid, fumaric acid, and propionic acid, respectively

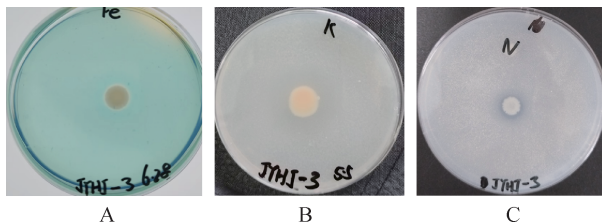


图8 菌株JYHJ-3产铁载体、解钾及固氮的能力

Fig. 8 The abilities of strain JYHJ-3 to produce siderophores, solubilize potassium, and fix nitrogen

注: A、B、C 分别为菌株在 CAS 培养基、硅酸盐培养基及 Ashby 固体培养基上产的橙色晕圈及透明圈

Note: A, B, and C represent the orange halos and transparent zones produced by the strain on CAS medium, silicate medium, and Ashby solid medium, respectively

2.8 菌株JYHJ-3培养条件的优化

2.8.1 单因素试验 碳源是微生物进行新陈代谢等活动的主要能量来源,葡萄糖、乳糖为碳源时的菌株JYHJ-3解磷量差异不显著,蔗糖、可溶性淀粉为碳源时的解磷量差异不显著;以乳糖为碳源时解磷量均高于其他碳源时,菌株生长效果最好(图9A);其次为葡萄糖、蔗糖、果糖、可溶性淀粉。氮源也是微生物生长发育的重要元素之一,5种不同氮源(硝酸钾、乙酸铵、氯化铵、硝酸钠和硫酸铵)对解磷细菌JYHJ-3的解磷能力差异不显著,当以乙酸铵为唯一氮源时,解磷量均显著高于其他碳源,其

次为氯化铵、硝酸钠、硝酸钾和硫酸铵(图9B)。

不同菌液接种量对菌株JYHJ-3的解磷能力差异显著,当菌液接种量为2%时,菌株JYHJ-3的解磷能力显著高于其他菌液接种量($P < 0.05$),菌株生长效果最好(图9C)。随着菌液接种量的增加,解磷能力逐渐降低,原因可能是接种量过大时,菌群会快速度过对数生长期(因营养消耗快),提前进入稳定期甚至衰亡期,导致解磷功能的“有效发挥时间”缩短,整体表现为解磷能力减弱。不同初始酸碱度显著影响菌株JYHJ-3的解磷能力($P < 0.05$),当初始pH值为5.5时,菌株JYHJ-3解磷能力最强,解磷量为 $50.089 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在初始pH值为5.0和6.0处理下解磷能力差异不显著,故后续响应面采取上述3种菌液接种量处理(图9D);初始pH值在5.5~7.5时,解磷能力随初始pH值的升高呈下降趋势,说明该菌株在实际应用中适用于偏酸性环境。在耐盐方面,菌株JYHJ-3在不同耐盐量下的解磷能力不同(图9E)。菌株JYHJ-3在1%含盐量下耐盐性能最好,随着含盐量的增加,解磷效果降低,说明菌株的解磷能力受到了抑制,菌株JYHJ-3在不含盐量下,与含盐量为1%,2%,3%,4%时耐盐性能差异不显著,与含盐量为5%时耐盐性能差异显著($P < 0.05$)。

2.8.2 响应面试验 根据单因素实验结果,对菌株JYHJ-3的接种量(A)、pH值(B)、NaCl(C)进行优化,共设计17组实验,重复3次,实验结果如下。方差分析结果表明,菌株JYHJ-3模型有效($P = 0.0001 < 0.05$):

$$\text{磷含量} = -1149.716 \quad 12 + 20.886 \quad 50A + 421.261 \quad 75B + 26.696 \quad 87C + 0.209 \quad 00AB - 0.425 \quad 00AC - 0.586 \quad 00BC - 4.250 \quad 38A^2 - 38.072 \quad 50B^2 - 9.842 \quad 12C^2$$

根据回归方程作出了JYHJ-3的响应面立体分析图,即3D曲面图与等高线图如图10所示。根据模型推测,当接种量为3%、初始pH值为5.5、NaCl为1%时,JYHJ-3菌液的磷含量可达到 $56.279 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据此培养条件,接入活化24 h后的JYHJ-3菌液,培养48 h后测得菌液的磷含量可达到 $58.547 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,略高于预测值。

3 讨论

植物根际是土壤-植物-微生物相互作用的关键微环境,因其富含根系分泌物和营养物质,成为解

磷微生物的重要栖息地^[4]。Joshi等^[26]从不同根际区域的土壤样本中筛选出的18株解磷菌,其中假单胞属为优势菌群;高佩等^[27]从野生中国沙棘根际土壤中分离到7株假单胞菌;Ahmad等^[28]从芥菜根际土壤中分离出耐喹禾灵和吡草酸的解磷促生铜绿假单胞菌PS1;Tianmin等^[29]研究了温哥华假单胞菌(*Pseudomonas vancouverensis*)PAN4菌株在不同培养条件下解磷能力的动态变化。本研究从藏东南色季拉山高寒环境下的药用植物卷叶黄精根际土壤中筛选获得9株解磷细菌,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)为优势菌,这可能是由于假单胞菌属的细菌在环境中分布广泛,而且具有较强的环境适应能力^[13]。此外,本研究还发现沙雷氏菌属*Serratia*、副伯克霍尔德菌属(*Paraburkholderia*)等解磷菌,丰富了高海拔药用植物根际解磷细菌的多样性,也为理解极端环境下磷素转化的微生物驱动机制提供了新视角。

产酸是解磷菌的主要途径之一^[30]。本研究菌株JYHJ-3可分泌7种有机酸,总有机酸含量达 $903.43\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,与蔺宝珺等^[31]报道的4株解磷菌分泌的总有机酸量($522.0\sim 900.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)一致;但显著高于葛紫怡等^[32]从吉林盐碱土分离的嗜冷假单胞菌MPP2402(总有机酸 $95.41\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)及黄达明等^[33]研究的洋葱伯克霍尔德菌P0417(优化后有机酸总量约 $587.75\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。有研究指出葡萄糖酸在解磷菌中发挥主要作用^[34],也有研究发现吡啶乙酸、酒石酸、草酸、苹果酸、苯乙酸、乳酸、琥珀酸、延胡索酸和富马酸等物质也是解磷菌分泌的重要有机酸组分^[35-36]。例如,Di等^[37]从森林土壤中分离到一株荧光假单胞菌,此菌以乙酸、琥珀酸为主要分泌物,通过“酸解+螯合”双重作用解磷,解磷量为 $25\sim 35\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;本研究中筛选得到的菌株JYHJ-3的主要分泌物为乳酸,高浓度乳酸的持续分泌可稳定维持环境低pH值,且乳酸的羟基与羧基可更高效螯合藏东南土壤中与磷结合的 Fe^{3+} 、 Al^{3+} ^[38],这一特性使其对酸性土壤中难溶性磷的转化效率更高。同时,7种有机酸的协同作用(草酸快速启动溶解、苹果酸增强螯合、丙酸扩展作用范围)扩大了磷素利用谱,这是单一有机酸主导的菌株难以比拟的^[39-40]。菌株JYHJ-3除解磷能力外,还具有产铁载体、解钾、固氮及产吡啶乙酸等多种促生特性,这一特性与Timofeeva等^[41]研究的菌株*Bacillus subtilis*

及周星朴等^[42]研究的菌株L17相似,并表现出潜在促进植物生长的作用。在色季拉山高寒、低有效磷的环境中,这类多功能菌株可通过解磷提升磷素利用率,同时通过固氮、解钾补充其他营养元素,帮助卷叶黄精适应恶劣环境,这为揭示药用植物在高海拔环境中的适应机制提供理论依据。

优化微生物培养条件,不仅可以了解微生物培养过程中的特性,还能够提高微生物的活菌率和功能酶活性。研究表明,碳源和氮源通过影响溶磷菌代谢产物(如有机酸等)的分泌,进而影响微生物的溶磷效果^[43]。例如,菌株W1(不动杆菌属)以葡萄糖为碳源时解磷能力最强^[44]; *Pantoea* sp. D2以葡萄糖为碳源时溶磷能力最优^[45]。而本研究中菌株JYHJ-3以乳糖为碳源时解磷能力最强,这与上述的解磷菌株以葡萄糖为碳源时的研究不同。JYHJ-3在pH值 $5.0\sim 5.5$ 范围内解磷能力增强,与色季拉山土壤pH值($5.5\sim 6.5$)一致。这种适应性显著区别于两类极端环境菌株:一是盐碱耐受菌(如MPP2402,pH值 $7.0\sim 10.0$ 生长),在酸性环境中解磷量下降 40% ^[33];二是强酸性适应菌(如*Nguyenibacter* sp. L1,pH值为 2.6 时Al-P溶解量最高)^[46],在pH值 >5.0 时酶活衰减 30% 。菌株JYHJ-3在NaCl为 1% 时解磷效果最优,盐浓度 $>2\%$ 时解磷量仅下降 20% ,显著优于高盐适应菌。这种低盐适配性避免了高盐菌株在低盐土壤中的“代谢冗余”,在低盐环境下会过度合成相容性溶质,消耗碳源用于抗逆而非解磷^[47]。王聪等^[48]通过响应曲面法发现AZ16与XT37数学模型显著($P < 0.05$),并推测对AZ16与XT37影响最大的是温度和pH值。Samad等^[49]利用Box-Behnken设计和响应面方法得到黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)菌株AGKT4的最大溶解度达到 $239.12\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。本研究通过响应曲面法得到JYHJ-3的最佳培养条件为“乳糖(碳源)+乙酸铵(氮源)+初始pH值 5.5 +接种量 $3\%+\text{NaCl }1\%$ ”,解磷量达到了 $58.547\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这一优化结果体现两大适配性:一是碳氮源偏好与卷叶黄精根际分泌物匹配——乳糖是植物根系分泌物的常见成分,乙酸铵可避免铵态氮对解磷菌的抑制;二是接种量与根际微生态平衡—— 3% 接种量既保证解磷效率,又避免过度繁殖导致的土著微生物竞争。

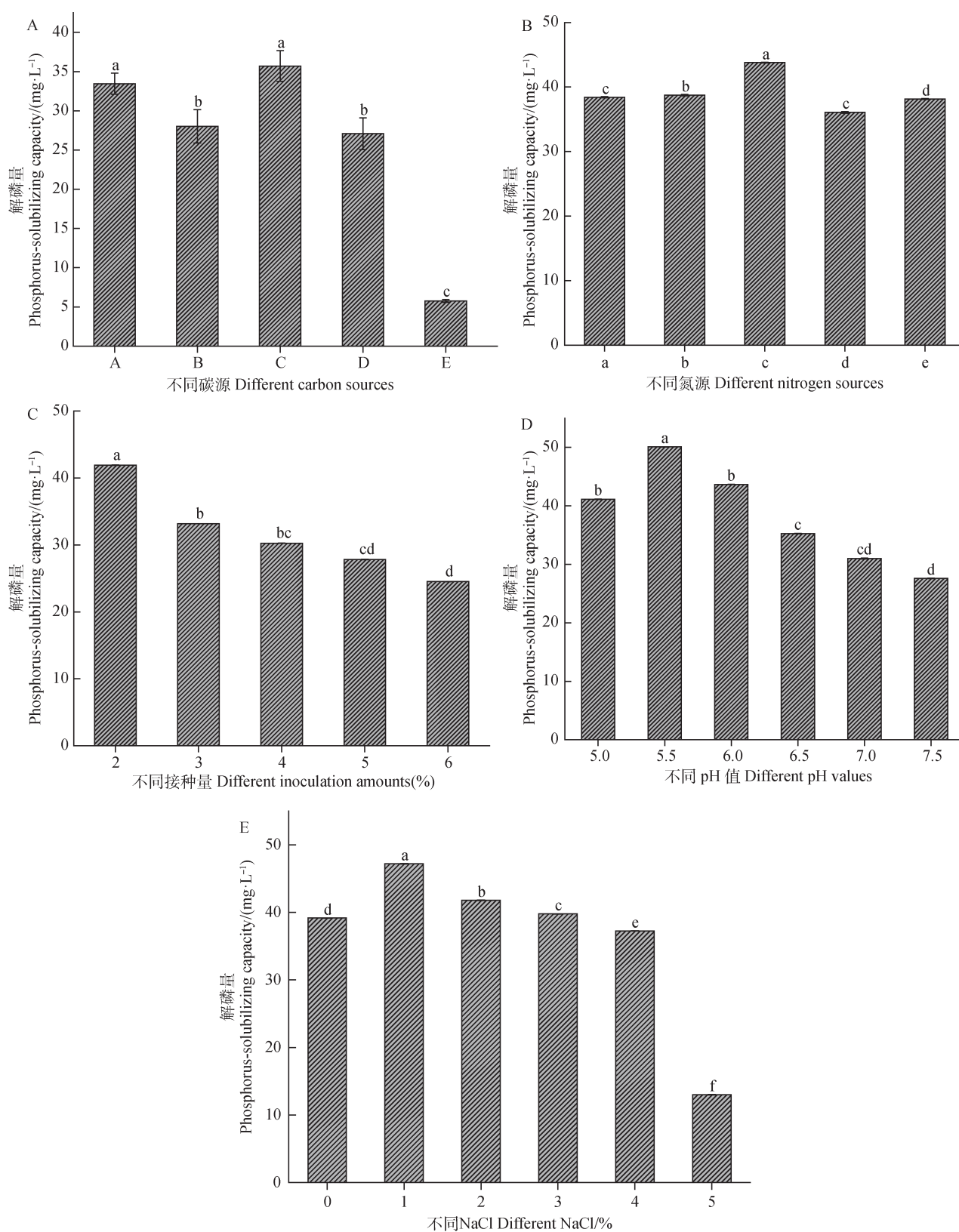


图 9 不同培养条件对菌株 JYHJ-3 解磷能力的影响

Fig. 9 Effects of different culture conditions on the phosphate-solubilizing capacity of strain JYHJ-3

注: A、B、C、D、E 分别为不同碳源(分别代表葡萄糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、果糖)、氮源(a、b、c、d、e 分别代表硝酸钠、氯化铵、乙酸铵、硫酸铵、硝酸钾)、菌液接种量、pH 值、NaCl 对 JYHJ-3 解磷能力的影响

Note: A, B, C, D, E stand for different carbon sources (glucose, sucrose, lactose, soluble starch, fructose respectively), nitrogen sources (a, b, c, d, e correspond to sodium nitrate, ammonium chloride, ammonium acetate, ammonium sulfate, potassium nitrate respectively), bacterial liquid inoculation volume, pH value, and NaCl—all of which influence the phosphorus-solubilizing ability of JYHJ-3

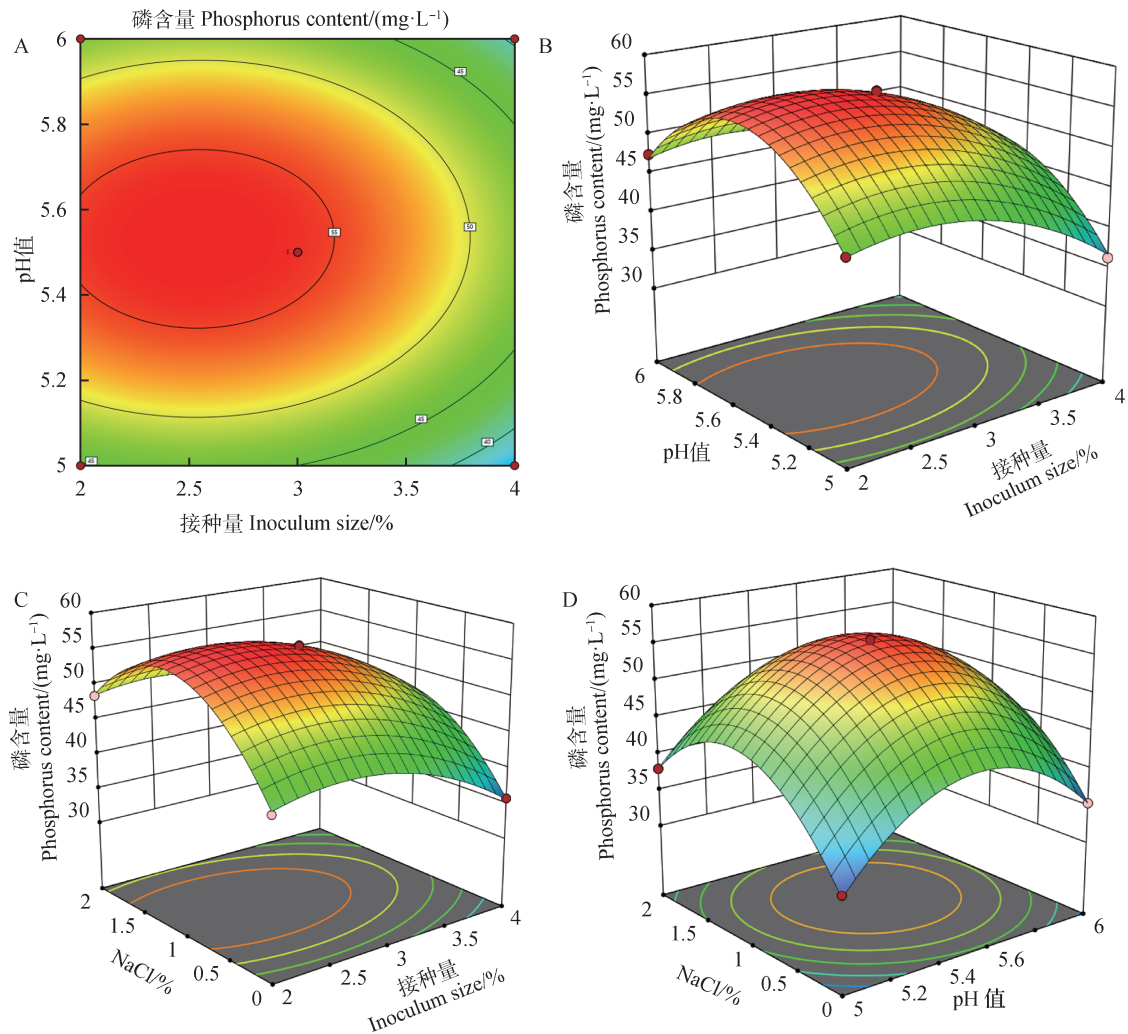


图10 优化菌株JYHJ-3等高线图和响应面立体分析图

Fig. 10 Contour map and response surface analysis map of strain JYHJ-3

注:A为AB的高线图;B、C、D分别为AB、AC、BC的响应面立体分析图

Note: A is the contour plot of AB; B, C, and D are the response surface three-dimensional analysis plots of AB, AC, and BC, respectively

4 结论

本研究从藏东南色季拉山卷叶黄精根际土壤中成功分离获得9株解磷细菌,分属变形菌门(Pseudomonas)、放线菌门(Actinobacteria)和厚壁菌门(Bacillota)3门6属,其中假单胞菌属(*Pseudomonas*)分离率最高(44.44%),为优势类群。经筛选得到菌株JYHJ-3解磷能力最优,鉴定为变形斑沙雷氏菌(*Serratia proteamaculans*)。该菌株可分泌草酸、酒石酸、乳酸等7种有机酸,且具有产铁载体、解钾、固氮及产吲哚乙酸(IAA)等多种促生能力。通过单因素试验和响应面试验优化,确定其最佳培养条件为:乳糖为碳源、乙酸铵为氮源、接种量为3%、初始pH值为5.5、NaCl为1%,此时解磷量达 $58.547 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。研究表明,卷叶黄精根际存在丰富的高效解磷细菌资

源,菌株JYHJ-3可作为藏药卷叶黄精可持续栽培及微生物肥料开发的潜在菌株。

参考文献

- [1] KUMAR R, NGANGKHAM U, ABDULLAH S N A. Editorial: phosphorus starvation in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1211439
- [2] CHANG D N, SONG Y R, LIANG H, et al. Planting Chinese milk vetch with phosphate-solubilizing bacteria inoculation enhances phosphorus turnover by altering the structure of the *phoD*-harboring bacteria community[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2024, 123: 103678
- [3] TANG X, LIU H Y, QIN H L, et al. Organic/inorganic phosphorus partition and transformation in long-term paddy cultivation in the Pearl River Delta, China[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13: 11122
- [4] PAN L, CAI B Y. Phosphate-solubilizing bacteria: advances in their physiology, molecular mechanisms and microbial commu-

- nity effects[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(12):2904
- [5] ZHAO Y, ZHANG M L, LIU Z Q, et al. Migration and transformation of soil phosphorus by organic acids: a global meta-analysis [J]. *Journal of Soils and Sediments*, 2024, 24(2): 589-602
- [6] 侯莹莹, 胡小梅. 3株玉米根际解磷菌筛选鉴定及促生作用研究[J]. *东北农业大学学报*, 2024, 55(5):46-55
- HOU Y Y, HU X M. Screening and identification of three strains of phosphate-solubilizing bacteria from maize rhizosphere and their roles in plant growth promoting effect[J]. *Journal of Northeast Agricultural University*, 2024, 55(5):46-55
- [7] TIMOFEEVA A, GALYAMOVA M, SEDYKH S. Prospects for using phosphate-solubilizing microorganisms as natural fertilizers in agriculture[J]. *Plants*, 2022, 11(16):2119
- [8] 庄馥璐, 柴小粉, 高蓓蓓, 等. 苹果根际解磷菌的分离筛选及解磷能力[J]. *中国农业大学学报*, 2020, 25(7):69-79
- ZHUANG F L, CHAI X F, GAO B B, et al. Isolation and screening of phosphorus-solubilizing bacteria in apple rhizosphere[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2020, 25(7):69-79
- [9] 郭小丹, 唐珊, 余水静. 脐橙根际解磷菌的分离鉴定及全基因组测序分析[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(10):39-47
- GUO X D, TANG S, YU S J. Isolation, identification and genome sequencing analysis of phosphorus-solubilizing bacteria in rhizosphere of navel orange [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(10):39-47
- [10] 李秀彤, 张迪, 赵福培, 等. 两株高效解磷菌的筛选及解磷性能分析[J]. *微生物学杂志*, 2024, 44(3):60-69
- LI X T, ZHANG D, ZHAO F P, et al. Screening and analysis of two strains of high efficiency phosphorus-soluble bacteria[J]. *Journal of Microbiology*, 2024, 44(3):60-69
- [11] DASILA H, SAH V K, JAGGI V, et al. Cold-tolerant phosphate-solubilizing *Pseudomonas* strains promote wheat growth and yield by improving soil phosphorus (P) nutrition status[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14:1135693
- [12] BAI K H, WANG W Y, ZHANG J N, et al. Effects of phosphorus-solubilizing bacteria and biochar application on phosphorus availability and tomato growth under phosphorus stress[J]. *BMC Biology*, 2024, 22(1):211
- [13] ADHIKARI P, JAIN R, SHARMA A, et al. Plant growth promotion at low temperature by phosphate-solubilizing *Pseudomonas* spp. isolated from high-altitude Himalayan soil [J]. *Microbial Ecology*, 2021, 82(3):677-687
- [14] 孙爱娣, 白雪蕊, 毕银丽. 神府矿区高效解磷菌的分离及其对煤矸石养分的活化作用[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(5): 2071-2086
- SUN A D, BAI X R, BI Y L. Isolation of efficient phosphorus-solubilizing bacteria capable of activating the nutrients of coal gangue from Shenfu mining area [J]. *Microbiology China*, 2025, 52(5):2071-2086
- [15] 中国科学院西北高原生物研究所. 藏药志[M]. 西宁:青海人民出版社, 1991:337-338
- Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences. Tibetan medicine records [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 1991:337-338
- [16] 李畅, 刘锐, 于运凯, 等. 黑土高效解磷菌的筛选及其对玉米的促生效果[J]. *微生物学通报*, 2025, 52(3):1101-1117
- LI C, LIU R, YU Y K, et al. Screening of efficient phosphate-solubilizing bacteria capable of promoting maize growth from black soil[J]. *Microbiology China*, 2025, 52(3):1101-1117
- [17] AMRI M, RJEIBI M R, GATROUNI M, et al. Isolation, identification, and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from Tunisian soils[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(3):783
- [18] 王莉晶, 高晓蓉, 吕军, 等. 解磷真菌 C2' 的分离鉴定及其在土壤中实际解磷效果的研究[J]. *土壤通报*, 2009, 40(4): 771-775
- WANG L J, GAO X R, LU J, et al. Phosphate-solubilizing mechanism of C2' and its actual phosphate-solubilizing effect in soil[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2009, 40(4):771-775
- [19] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 4版. 北京:高等教育出版社, 2007:210-230
- SHEN P, CHEN X D. Microbiology Experiments [M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007:210-230
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001:120-250
- DONG X Z, CAI M Y. Handbook for Systematic Identification of Common Bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2001: 120-250
- [21] 马连杰, 张慧, 尹学伟, 等. 高效解磷菌 RL-7 的鉴定、解磷能力及促生效应[J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(14):280-284
- MA L J, ZHANG H, YIN X W, et al. Identification, phosphate-solubilizing capacity and growth-promoting effect of an efficient phosphate-solubilizing bacteria RL-7 [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2024, 52(14):280-284
- [22] CHOUYIA F E, VENTORINO V, PEPE O. Diversity, mechanisms and beneficial features of phosphate-solubilizing *Streptomyces* in sustainable agriculture: A review[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:1035358
- [23] BOUIZGARNE B, BAKKI M, BOUTASKNIT A, et al. Phosphate and potash solubilizing bacteria from Moroccan phosphate mine showing antagonism to bacterial canker agent and inducing effective tomato growth promotion[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14:970382
- [24] 王明欢, 张小娜, 林冰, 等. 中药药渣中固氮菌、解磷菌、解钾菌的筛选[J]. *中成药*, 2020, 42(2):531-533
- WANG M H, ZHANG X N, LIN B, et al. Screening of nitrogen-fixing bacteria, phosphorus-solubilizing bacteria and potassium-solubilizing bacteria in traditional Chinese medicine residue[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2020, 42(2):531-533
- [25] CHAIHARN M, LUMYONG S. Screening and optimization of indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization from rhizobacteria aimed at improving plant growth[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(1):173-181
- [26] JOSHI S, GANGOLA S, JAGGI V, et al. Functional characterization and molecular fingerprinting of potential phosphate solubilizing bacterial candidates from Shisham rhizosphere[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13:7003
- [27] 高佩, 徐淑琴, 贺曦, 等. 野生中国沙棘根际假单胞菌菌株的筛选鉴定及其对油菜促生效果的影响[J]. *福建农业学报*, 2024, 39(12):1402-1411

- GAOP, XUSQ, HEX, et al. *Pseudomonas* in *Hippophae rhamnoides* rhizosphere affecting growth of *Ipomoea aquatica* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 39 (12): 1402-1411
- [28] AHEMAD M, KHAN M S. Phosphate-solubilizing and plant-growth-promoting *Pseudomonas aeruginosa* PS1 improves greengram performance in quizalafop-p-ethyl and clo dinafop amended soil [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2010, 58(2): 361-372
- [29] 譙天敏, 李姝江, 韩珊, 等. 温哥华假单胞菌菌株PAN4解磷能力及对核桃的促生作用[J]. *华南农业大学学报*, 2015, 36(5): 117-124
- QIAO T M, LI S J, HAN S, et al. The phosphate-solubilizing ability and growth promoting effects of *Pseudomonas vancouverensis* strain PAN4 on walnut [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2015, 36(5): 117-124
- [30] TANDON A, FATIMA T, SHUKLA D, et al. Phosphate solubilization by *Trichoderma koningiopsis* (NBRI-PR5) under abiotic stress conditions [J]. *Journal of King Saud University - Science*, 2020, 32(1): 791-798
- [31] 蒯宝珺, 杨文权, 赵帅, 等. 高寒草甸植物根际溶磷菌的筛选鉴定及其溶磷与促生效果[J]. *草地学报*, 2022, 30(11): 3132-3139
- LIN B J, YANG W Q, ZHAO S, et al. Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria in plant rhizosphere of alpine meadow and their effects on phosphate-solubilizing and plant growth promotion [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2022, 30(11): 3132-3139
- [32] 葛紫怡, 王思宇, 苏旭, 等. 低温耐盐碱解磷菌的筛选及其作用分析[J]. *微生物学报*, 2025, 65(12): 5573-5589
- GE Z Y, WANG S Y, SU X, et al. Isolation and function analysis of phosphate-solubilizing bacteria with psychrotolerance and saline-alkaline tolerance [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(12): 5573-5589
- [33] 黄达明, 李倩, 管国强, 等. 一株解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷培养条件的优化[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(2): 173-178
- HUANG D M, LI Q, GUAN G Q, et al. Selection, identification and medium optimization of a phosphatesolubilizing bacterium [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(2): 173-178
- [34] JOSHI E, IYER B, RAJKUMAR S. Glucose and Arabinose dependent mineral phosphate solubilization and its succinate-mediated catabolite repression in *Rhizobium* sp. RM and RS [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(5): 551-557
- [35] BISPO R L B, CECCATO-ANTONINI S R, TAKITA M A, et al. Exogenous indole-3-acetic acid production and phosphate solubilization by *Chlorella vulgaris* Beijerinck in heterotrophic conditions [J]. *Fermentation*, 2023, 9(2): 116
- [36] ZULUAGA M Y A, DE OLIVEIRA A L M, VALENTINUZZI F, et al. An insight into the role of the organic acids produced by *Enterobacter* sp. strain 15S in solubilizing tricalcium phosphate: *in situ* study on cucumber [J]. *BMC Microbiology*, 2023, 23(1): 184
- [37] DI SIMINE C D, SAYER J A, GADD G M. Solubilization of zinc phosphate by a strain of *Pseudomonas fluorescens* isolated from a forest soil [J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1998, 28(1): 87-94
- [38] HAMADA Y Z, CARLSON B, DANGBERG J. Interaction of malate and lactate with chromium(III) and iron(III) in aqueous solutions [J]. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, 2005, 35(7): 515-522
- [39] LIN S M, YU Y L, ZHANG Z J, et al. The synergistic mechanisms of citric acid and oxalic acid on the rapid dissolution of kaolinite [J]. *Applied Clay Science*, 2020, 196: 105756
- [40] VEHMAANPERÄ P, SALMIMIES R, HÄKKINEN A. Thermodynamic and kinetic studies of dissolution of hematite in mixtures of oxalic and sulfuric acid [J]. *Mining, Metallurgy & Exploration*, 2021, 38(1): 69-80
- [41] TIMOFEEVA A M, GALYAMOVA M R, SEDYKH S E. Plant growth-promoting soil bacteria: nitrogen fixation, phosphate solubilization, siderophore production, and other biological activities [J]. *Plants*, 2023, 12(24): 4074
- [42] 周星朴, 沈依华, 张文丽, 等. 一株根际多功能解磷菌的分离、筛选及鉴定[J]. *西昌学院学报(自然科学版)*, 2025, 39(1): 23-30
- ZHOU X P, SHEN Y H, ZHANG W L, et al. Isolation, screening, and identification of a multifunctional phosphate-solubilizing bacterium from rhizosphere soil [J]. *Journal of Xichang University (Natural Science Edition)*, 2025, 39(1): 23-30
- [43] SANCHEZ-GONZALEZ M E, MORA-HERRERA M E, WONG-VILLARREAL A, et al. Effect of pH and carbon source on phosphate solubilization by bacterial strains in peptone medium [J]. *Microorganisms*, 2023, 11(1): 49
- [44] 赵君, 饶惠玲, 王耘籽, 等. 红壤区杉木根际高效解磷菌的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2022, 61(1): 112-121
- ZHAO J, RAO H L, WANG Y Z, et al. Screening, identification and optimization of culture conditions of two high-efficiency phosphorus-solubilizing bacteria in the rhizosphere of *Cunninghamia lanceolata* in red soil areas [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2022, 61(1): 112-121
- [45] WANG J J, YAN A H, WANG W, et al. Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of phosphate-solubilizing bacteria strain D2 (*Pantoea* sp.) in rhizosphere of *Pinus tabulaeformis* in iron tailings yard [J]. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao*, 2016, 27(11): 3705-3711
- [46] LI X L, ZHAO X Q, DONG X Y, et al. Secretion of gluconic acid from *nguyenibacter* sp. L1 is responsible for solubilization of aluminum phosphate [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 784025
- [47] TELES E A P, XAVIER J F, ARCÊNIO F S, et al. Characterization and evaluation of potential halotolerant phosphate solubilizing bacteria from *Salicornia frutescens* rhizosphere [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 14: 1324056
- [48] 王聪, 凌娟, 张燕英, 等. 海洋固氮菌和解磷菌的分离鉴定及发酵条件优化[J]. *微生物学报*, 2018, 58(5): 817-829
- WANG C, LING J, ZHANG Y Y, et al. Isolation, characterization and culture optimization of nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere sediments of *Haplophila ovalis* [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(5): 817-829
- [49] SAMAD M Y A, ZULKEFIS, EKUNESALISUM, et al. Optimization of liquid medium for high phosphate solubilization by *Serratia marcescens* strain AGKT4 [J]. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 2017, 5(12): 1626-1632