

doi: 10.11838/sfsc.20170323

一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究

杜雷, 王素萍, 陈钢*, 洪娟, 黄翔, 张利红, 叶莉霞, 练志诚, 张贵友

(武汉市农业科学技术研究院作物科学研究所, 湖北 武汉 430000)

摘要: 从武汉市黄陂区长期种植的蔬菜大棚作物根际分离筛选出多株解磷细菌, 经过多次筛选纯化获得一株性状稳定的高效解磷细菌 P1。根据生理生化特征和 16S rDNA 序列分析, 鉴定菌株 P1 为根瘤菌属 (*Ensifer*)。研究了不同发酵条件对 P1 菌株解磷能力的影响, 确定了菌株 P1 的最佳培养条件为发酵时间 7 d、初始 pH 值 8、接种量 2%, 在该条件下菌株 P1 溶解磷酸三钙的量为 443.11 mg/L。试验还发现菌株 P1 的溶磷量与培养液的 pH 值呈极显著负相关性。

关键词: 根瘤菌; 解磷菌; 溶磷能力; 微生物肥料

中图分类号: Q939.1

文献标识码: A

文章编号: 1673-6257 (2017) 03-0136-06

磷是植物生长必需的三大营养元素之一, 我国土壤全磷含量较高, 耕地土壤全磷含量一般为 0.02% ~ 0.11%^[1], 但能被植物直接吸收利用的有效磷含量一般不超过全磷量的 5%。大部分磷肥与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 等结合, 形成难溶性磷酸盐, 我国有 74% 的耕地土壤缺磷, 土壤中 95% 以上的磷为无效形式, 土壤有效磷的缺乏是限制植物生长的主要因素之一^[2]。为了获得高产, 人们每年都向土壤反复施加大量磷肥, 由于作物对施入的磷肥当季利用率只有 5% ~ 10%, 大部分磷肥以难溶的无效态在土壤中积累起来^[3]。长期大量施用磷肥不仅降低土壤对磷的吸附量, 加大各种形态磷素向土体较深层次土壤迁移的能力, 使土壤中各种形态磷在土体中出现明显积累的土层逐渐加深, 从而增加了土壤的渗漏率, 加大其对水体富营养化的风险^[4], 同时增加了种植成本。

土壤中存在大量的具有解磷能力的微生物, 能够将难溶性的磷酸盐如磷矿粉转化为水溶性磷, 提高土壤中的可溶性磷含量, 从而改善植物磷素营养, 提高作物产量, 降低土壤磷素污染风险^[5-6]。目前已报道的具有解磷能力的微生物包括细菌、真

菌和放线菌^[7-8]等, 其中溶磷细菌的数量和种类较多, 主要有芽孢杆菌 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、根瘤菌属 (*Ensifer*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、色杆菌属 (*Chromobacterium*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*) 等^[9-11]。利用解磷微生物活化土壤难溶性磷因具有高效、环保, 且与土壤亲和等特点越来越受到人们的重视。由于不同种类的溶磷菌或同种不同菌株之间的溶磷能力都有明显的差异, 所以筛选出具有高效溶磷能力的菌株显得尤为重要。本试验从长期种植的蔬菜大棚中筛选出一株高效解磷菌株, 并研究了不同接种量、初始 pH 值和发酵时间对其溶磷能力的影响, 为开发解磷微生物肥料提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土壤样品

土样于 2015 年上半年采自湖北省武汉市黄陂区有 10 年以上种植龄的蔬菜基地作物根际土壤, 采用“抖落法”收集根际土壤放入塑料样品采集袋中, 封口, 立刻带回实验室 4 °C 保存。

1.1.2 培养基

难溶性无机磷培养基: 葡萄糖 10 g, 磷酸三钙 5 g, 硫酸铵 0.5 g, 氯化钠 0.3 g, 氯化钾 0.3 g, 七水硫酸镁 0.3 g, 七水硫酸亚铁 0.03 g, 一水硫酸锰 0.03 g, 琼脂粉 18 g, 蒸馏水 1 L, pH 值 7.0 ~ 7.2。

收稿日期: 2016-03-29; 最后修订日期: 2016-05-22

基金项目: 武汉市农科院集成创新项目 (extd201505)。

作者简介: 杜雷 (1985-), 男, 湖北咸宁人, 农艺师, 硕士, 主要从事土壤微生物和植物营养等方向研究。E-mail: dulei428@163.com。

通讯作者: 陈钢, E-mail: gchen2006@163.com。

液体筛选培养基: 葡萄糖 10 g, 磷酸三钙 5 g, 氯化镁 5 g, 七水硫酸镁 0.25 g, 氯化钾 0.2 g, 硫酸铵 0.1 g, 蒸馏水 1 L, pH 值 7.0~7.2。

溶菌肉汤培养基 (LB): 胰蛋白胨 10 g, 酵母浸出粉 5 g, NaCl 10 g, 蒸馏水 1 L, pH 值 7.0~7.2。

LB 固体培养基: 在液体 LB 培养基中加琼脂 18 g。

1.2 试验方法

1.2.1 初筛

称取 10 g 根际土壤样品加入 90 mL 无菌水中, 25 °C 摇床振荡 30 min。取上清液逐级稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 分别取各浓度样品 0.1 mL 涂布于平板培养基上, 28 °C 培养 5 d。每个浓度重复 3 次。选择生长较快、D/d (D: 透明圈直径, d: 菌落直径) 较大的菌落, 挑起并转至斜面培养基直至菌苔长起, 置于 4 °C 保存。

1.2.2 复筛

活化初筛出的各菌株, 经斜面镜检后刮入 LB 培养基中, 在 28 °C、180 r/min 条件下, 培养 24 h。取相同浓度的各菌株样品按 2% 接种到可溶性磷液体培养基中, 28 °C、180 r/min 进行培养 7 d, 测定培养液中水溶性磷含量, 最终确定高效稳定的解磷菌株。

1.2.3 可溶性磷测定方法

将培养液以 10 000 r/min 离心, 上清液经适当稀释后, 用钼锑抗比色法直接测定培养液中的有效磷^[12]。

1.2.4 生理生化鉴定

将筛选好的解磷菌株划线纯化后, 观察菌落大小、颜色等特征, 革兰氏染色, 显微镜观察个体形态, 另外, 进行葡萄糖发酵、柠檬酸盐试验、硫化氢试验、接触酶检验等生理生化鉴定^[13]。

1.2.5 分子生物学鉴定

以 16S rRNA (27F: 5' - AGAGTTTGATCCTG GCTCAG - 3' 和 1540R: 5' - AGGAGGTGATCCAGC CGCA - 3') 的保守型序列为引物进行扩增, 扩增产物纯化回收后, 送武汉伯尔生物科技有限公司测序, 将所得序列在 GenBank 核酸序列数据库进行序列比较, 采用 MEGA6 软件进行同源性分析, 构建系统发育树。

1.2.6 发酵时间试验

将筛选出的最佳解磷菌株接种 1~2 环于 LB 培养基上, 28 °C, 200 r/min 培养 22 h 左右, 作为种子液。按 2% 的接种量接种到无机磷液体筛选培养

基中, 28 °C、200 r/min 分别培养 1、2、3、4、5、6、7、8 d, 测定发酵液中可溶性磷和 pH 值, 每组处理均做 3 次重复。

1.2.7 接种量试验

将种子液按 1%、2%、3%、4% 和 5% 的接种量接种到无机磷液体筛选培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 7 d, 测定发酵液中可溶性磷和 pH 值, 每组处理均做 3 次重复。

1.2.8 初始 pH 值试验

调节无机磷液体筛选培养基的初始 pH 值为 5、6、7、8 和 9, 接种量 2%, 28 °C、200 r/min 培养 7 d, 测定发酵液中可溶性磷和 pH 值, 每组处理均做 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌的初筛

经初筛 28 °C 培养 5 d 后, 共有 79 株菌能够在难溶性无机磷固体培养基上生长, 其中有 28 个能产生明显的溶磷圈, 将产生溶磷圈的菌株编号为 P1~P28。具体 D/d 见表 1。从表 1 可以看出, 其中 P1、P2、P8、P13、P14、P17 和 P27 透明圈直径都超过了 13 mm, 并且透明圈直径 D 与菌落直径 d 比都超过了 2.0, 其中 P1 菌株的溶磷圈最大, D/d 值为 3.42。

2.2 复筛

在初筛的基础上, 选择透明圈直径和 D/d 值都较大的菌株进行摇瓶试验, 同时以不接菌为对照, 其解磷效果见表 2。发酵液中可溶性磷的浓度, CK 仅为 0.54 mg/L, 所有接种处理均为 CK 的 100 倍以上, 其中 P1 菌株可溶性磷含量最高, 为 324.48 mg/L, 其它菌株的溶磷效果大小顺序为 P2 > P8 > P27 > P17 > P14 > P13, 发酵液最终 pH 值与发酵液中可溶性磷含量成反比, pH 值越低, 可溶性磷含量越高, CK 处理的 pH 值几乎没有下降, 为最初 pH 值。

2.3 菌株的生理生化特征

根据解磷菌复筛结果, P1 菌株的解磷效果最佳, 在 28 °C 条件下, P1 菌株在 NB 固体培养基上, 菌落呈圆形、点状、边缘整齐、表面湿润光滑、不透明、白色、中心隆起。

对其生理生化指标测定, 结果见表 3。该菌株为好氧性, 革兰氏阴性菌; 不能利用柠檬酸盐和丙酸盐, 在低于 2% NaCl 培养基下能正常生长, 高于 5% NaCl 培养基上不能生长; 接触酶反应、V-P

反应、氧化酶反应、葡萄糖发酵产酸、产 H₂S、硝酸盐还原、运动性试验为阳性反应；甲基红试验、明胶液化和淀粉水解试验为阴性；能利用葡萄糖、阿拉伯糖和木糖生长茂盛，不能利用甘露糖。

表 1 解磷菌的平板初筛结果

菌株	D (mm)	D/d	菌株	D (mm)	D/d
P1	20.50	3.42	P15	7.50	1.25
P2	17.50	2.68	P16	10.00	1.47
P3	8.50	1.31	P17	15.00	2.22
P4	8.40	1.43	P18	11.50	1.63
P5	7.20	1.25	P19	8.50	1.57
P6	8.50	1.36	P20	11.20	1.62
P7	9.50	1.39	P21	9.40	1.36
P8	16.50	2.45	P22	10.00	1.39
P9	9.00	1.43	P23	14.50	1.68
P10	11.50	1.56	P24	9.50	1.54
P11	9.50	1.40	P25	11.00	1.57
P12	8.90	1.47	P26	9.50	1.43
P13	13.40	2.03	P27	14.50	2.18
P14	15.50	2.15	P28	11.50	1.65

表 2 解磷细菌的摇瓶筛选结果

菌株	可溶性磷 (mg/L)	pH 值
P1	324.48 ± 17.52a	4.26
P2	257.13 ± 10.61b	4.75
P8	214.76 ± 11.12c	4.64
P13	66.98 ± 10.76g	5.68
P14	127.35 ± 11.67f	5.13
P17	150.35 ± 2.68e	4.91
P27	179.21 ± 7.33d	4.85
不接菌 (CK)	0.54 ± 0.042h	7.90

注：同列数据不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

表 3 P1 菌株的生理生化特征

鉴别特征	结果	鉴别特征	结果
好氧性	+	产 H ₂ S	+
革兰氏反应	-	硝酸盐还原	+
接触酶反应	+	丙酸盐利用	-
V-P 反应	+	明胶液化	-
柠檬酸盐利用	-	淀粉水解	-
甲基红试验	-	运动性	+
氧化酶反应	+	碳源化合物产酸:	
耐盐性: 1% NaCl	+	L-阿拉伯糖	+
2% NaCl	+	D-葡萄糖	+
5% NaCl	-	D-甘露糖	-
7% NaCl	-	D-木糖	+
10% NaCl	-		

注：+ 阳性；- 阴性。

2.4 分子生物学鉴定

将菌株的 16S rDNA 序列与 GenBank 核酸数据库中其它的 16S rDNA 序列进行同源性比较，采用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。如图 1 所示，P1 菌株和 *Sinorhizobium meliloti* (X67222.2) 位于同一分支，同源性达到 99%，通过对 P1 进行形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析多方面的鉴定，初步将 P1 菌株分类为根瘤菌属 (*Ensifer*)。

2.5 发酵时间对溶磷效果的影响

供试菌株在接种 1 d 后开始测定发酵液中的可溶性磷含量及 pH 值，然后每隔一天测一次。结果见图 2。随着发酵时间的延长，溶磷量也随之增加，发酵第 7 d 时溶磷量达到最大值，之后趋于稳定。发酵液 pH 值与溶磷量呈一定的负相关性，随着接种时间的延长，溶磷量逐渐增多，pH 值逐渐下降，当溶磷量达最高值时，pH 值降到最低，然后趋于稳定。

2.6 不同接种量对溶磷效果的影响

接种量是与培养基利用率直接相关的参数。大的接种量尽管可以使细菌生长快、周期短，但后期可能因缺乏营养而无法实现高细菌生长量；而接种量太少不仅对营养利用不充分，且发酵周期可能延长，染菌几率提高。如图 3 可知，当接种量为 2% 时，发酵液可溶性磷含量最高，达 443.11 mg/L。发酵液最终 pH 值与溶磷量也呈负相关性。

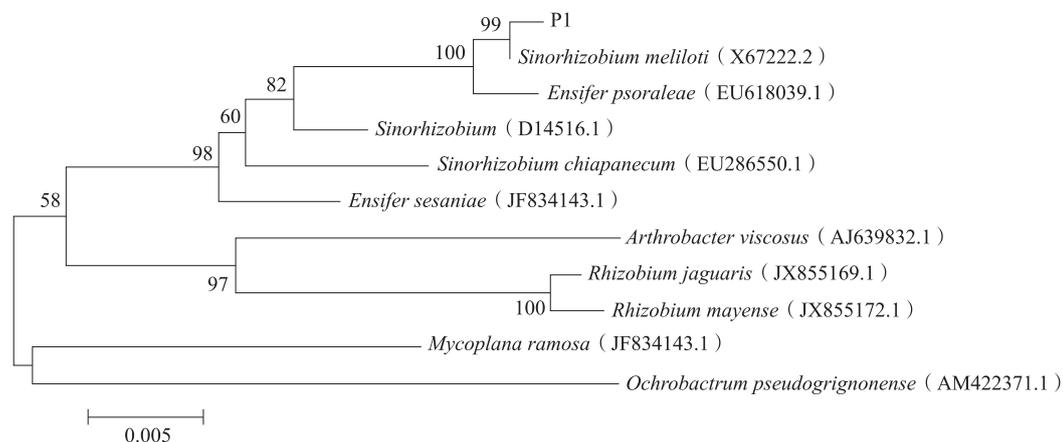


图1 P1 菌株 16S rDNA 的系统发育树

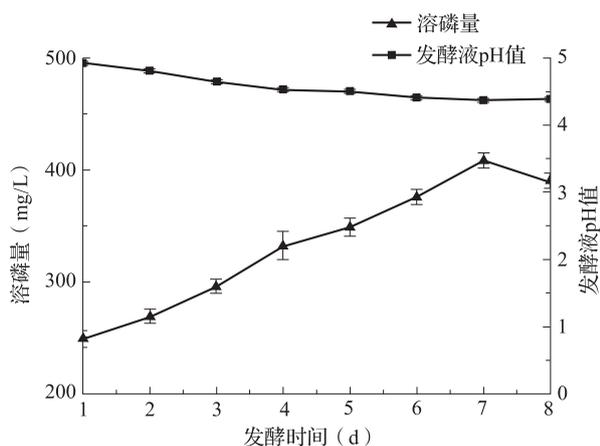


图2 发酵时间对可溶性磷含量的影响

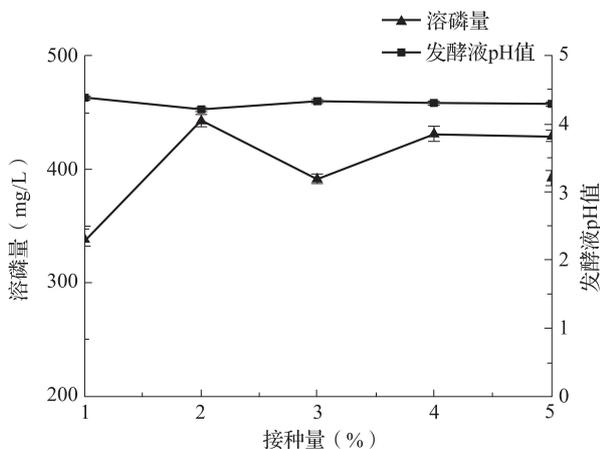


图3 接种量对可溶性磷含量的影响

内选择 5、6、7、8、9 进行 pH 值对 P1 菌株的溶磷量影响的研究, 结果如图 4 所示。培养基初始 pH 值水平会对微生物的生长和代谢产物的合成产生明显的影响, P1 菌解磷最适 pH 值为 8, 再增加或者降低, 解磷活力均不同程度地减弱。发酵液最终 pH 值与溶磷量也呈负相关性。

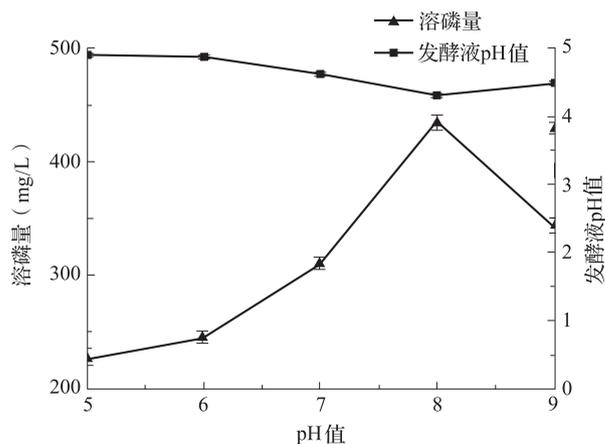


图4 pH 值对可溶性磷含量的影响

3 小结与讨论

本试验以磷酸三钙做控制磷源, 在难溶性磷源环境下, 用平板筛选法初筛得到 28 株具有溶磷圈的细菌, 再通过摇瓶培养法复筛, 并通过继代培养确定了菌株解磷能力的稳定性, 最终确定 P1 菌株为最高效解磷菌株, 其解磷能力为 324.48 mg/L。通过对 P1 菌株进行形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析多方面的鉴定, 初步将 P1 菌株分类为根瘤菌 (*Ensifer*)。传统上认为根瘤菌发挥肥效主要是在结瘤状态, 处于根瘤共生体中的菌体难以接触外界土壤, 无法发挥其解磷作用^[14]。因此,

2.7 初始 pH 值对溶磷效果的影响

pH 值是菌种生长的化学因子, 对微生物生长的影响很大。确定合适的 pH 值有利于提高溶磷效率。设定无机磷培养基不同的初始 pH 值, 细菌生长的最适 pH 值一般为 6~9, 为此实验在这一范围

解磷根瘤菌的应用并未获得广泛关注, 相关的研究仍以筛选 - 验证为主。20 世纪中叶, 一些学者发现某些根瘤菌除结瘤固氮外也具有分解难溶性磷酸盐或难溶性有机磷的能力^[15]。Weaver^[16]研究表明, 在根瘤衰败破裂后, 会有大量的根瘤菌菌体进入根际土壤且能够正常的增殖, 有的菌株在无宿主存在的环境下可在土壤中存活 20 年以上, 随着根瘤菌的衰败和更新, 植物在结瘤固氮时, 根际同时存在大量游离态的菌体, 因此解磷根瘤菌在作物的根际也有相当的解磷促生效果。Li 等^[17]的研究也表明, 解磷根瘤菌能有效缓解植物在仅提供难溶性无机磷的环境中受到的缺磷胁迫, 并使之恢复正常生长。Chabot 等^[18]指出不同解磷根瘤菌的解磷能力差异可达数倍。张希涛等^[19]在海南、广州等地分离出的 200 余株相思根瘤菌中, 40 余株具有解磷能力, 其中能力最强的菌株 2 d 内的解磷量达 9.94 mg/L。韩梅等^[20]在沈阳农业大学科研基地分离出 20 株根瘤菌, 其中能力最强的菌株 7 d 内的解磷量达 35.50 mg/L。本试验分离到的 P1 菌株与它们相比, 其解磷能力提高了 10 倍以上, 具有较强的解磷能力, 因此有望成为开发高效微生物磷肥的优良微生物资源。

大量研究^[21-22]表明, pH 值与解磷量呈极显著负相关性, 但也有报道^[23-24]认为两者之间存在显著的相关性。解磷微生物溶解难溶性磷酸盐的机理有两种, 一是在微生物代谢过程中产生的质子与磷矿粉中的铁、铝、钙、镁等离子交换作用; 二是由于有机酸类物质与这些离子结合, 发生沉淀、络合、螯合反应, 从而使磷酸根释放出来。本试验发现, P1 菌株的溶磷量与 pH 值之间呈极显著负相关性。

微生物溶磷是一个漫长的过程, 首先微生物要自身扩大生长, 然后发生一系列代谢过程, 从而使难溶性磷酸盐释放出来。本试验针对发酵周期长做了动态溶磷分析, 确定 P1 菌株在第 7 d 达到最大溶磷效果, 之后趋于稳定。本试验在研究 P1 菌株的发酵条件时, 在适度的 pH 值范围内, 该菌株都具有明显的溶磷效果, 适合实际应用。培养条件试验虽然可为其工业发酵生产微生物菌剂提供参数依据, 但农作物根际土壤环境复杂, 营养成分相对缺乏, 关于其促生作用效果在进一步研究中, 从而为后期研发微生物肥料提供科学依据。

参考文献:

- [1] 王光华, 赵英, 周德瑞, 等. 解磷菌的研究现状与展望 [J]. 生态环境, 2003, 12 (1): 96-100.
- [2] 吴平, 印莉萍, 张立平. 植物营养分子生理学 [M]. 北京: 科技出版社, 2001.
- [3] 盛荣, 肖和艾, 谭周进, 等. 土壤解磷微生物及其磷素有效性转化机理研究进展 [J]. 土壤通报, 2012, 41 (6): 1505-1510.
- [4] 黄东风, 王果, 李卫华, 等. 菜地土壤氮磷面源污染现状、机制及控制技术 [J]. 应用生态学报, 2009, 20 (4): 991-1001.
- [5] 张毅民, 孙亚凯, 吕学斌, 等. 高效溶磷菌株 Bmp5 筛选及活力和培养条件的研究 [J]. 华南农业大学学报, 2006, 27 (3): 61-65.
- [6] 陈俊, 陆俊锬, 康丽华, 等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养 [J]. 微生物学通报, 2009, 36 (8): 1183-1188.
- [7] 林启美, 赵小蓉, 孙炎鑫, 等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布 [J]. 土壤与环境, 2000, 9 (1): 34-37.
- [8] 李文红, 施积炎. 西湖沉积物中解磷菌的分离纯化及其解磷能力 [J]. 应用生态学报, 2006, 17 (11): 2112-2116.
- [9] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展 [J]. 土壤肥料, 2001, (3): 7-11.
- [10] Rodriguiz H, Rossolini G M, Gonzalez T. Isolation of a gene from Burkholderia CepaciaS-16 encoding a protein that facilitates phosphatase activity [J]. Curr Microbiol, 2000, 40 (2): 13-17.
- [11] Peix A, Rivas-Boyer A A, Mateos P F, et al. Growth promotion of chickpea and barely by a phosphate solubilizing strain of Mesorhizobium mediterraneum under growth chamber conditions [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 103-110.
- [12] 朱培森, 杨兴明, 徐阳春, 等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用 [J]. 应用生态学报, 2007, 18 (1): 107-112.
- [13] Buchanan. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed [M]. Beijing, China: Science press, 1984.
- [14] 李剑峰. 解磷根瘤菌诱变选育及抗污染菌剂制备关键技术研究 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2011. 87-112.
- [15] Antoun H A, Beauchamp C J, Goussard N, et al. Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (Raphanus sativus L) [J]. Plant Soli, 1998, 204: 57-67.
- [16] Weaver R W, Frederick L R. Effect of inoculum rate on competitive nodulation of Glycine max L. Merrill. II. Field studies [J]. Agronomy Journal, 1974, 66 (2): 233-236.
- [17] Li J F, Zhang S Q, Hou P H, et al. Effect of phosphate solubilizing rhizobium and nitrogen fixing bacteria on growth of alfalfa

- seedlings under P and N deficient conditions [J]. Pakistan Journal of Botany, 2013, 45: 1557 – 1562.
- [18] Chabot R, Antoun H, Cescas M P. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate – solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *Phaseoli* [J]. Plant Soil, 1996, 184: 311 – 321.
- [19] 张希涛, 康丽华, 马海滨. 具有解磷能力的相思根瘤菌的筛选 [J]. 林业科学研究, 2008, 21 (5): 311 – 321.
- [20] 韩梅, 于芳, 肖亦农, 等. 1 株具解磷特性大豆根瘤菌的分离筛选与回接鉴定 [J]. 微生物学杂志, 2010, 2 (30): 51 – 56.
- [21] 王岳坤, 于飞, 唐朝荣. 海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定 [J]. 微生物学报, 2009, 49 (1): 63 – 71.
- [22] 潘成荣, 丁凡, 郑志侠, 等. 瓦埠湖沉积物内源磷的稳定性及其控制研究 [J]. 合肥工业大学学报, 2010, 33 (8): 1226 – 1229.
- [23] Cheng G C, He Z L, Wang Y J. Impact of pH on microbial biomass carbon and microbial phosphorus in red soils [J]. Pedosphere, 2004, 14 (1): 9 – 15.
- [24] Feng K, Lu H M, Sheng H J, et al. Effect of organic ligands on biological availability of inorganic phosphorus in soils [J]. Pedosphere, 2004, 14 (1): 85 – 92.

Isolation and identification of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its phosphate-solubilizing capacity

DU Lei, WANG Su-ping, CHEN Gang*, HONG Juan, HUANG Xiang, ZHANG Li-hong, YE Li-xia, LIAN Zhi-cheng, ZHANG Gui-you (Institute of Crop Sciences, Wuhan Academy of Agricultural Science and Technology, Wuhan Hubei 430000)

Abstract: Various phosphate-solubilizing bacterial strains were isolated from the long term planting of vegetable greenhouse rhizosphere in Huangpi district of wuhan city. After many times of screening and purification, a strain P1 with efficient phosphate-solubilizing capability was obtained. According to physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, the strain of P1 was identified as belonging to *Ensifer*. The effect of different fermentation conditions on the phosphate-solubilizing capacity of P1 strain was studied. Under the optimal conditions in which the fermentation time was 7 days, initial pH was 8 and inoculum size was 2%, P1 dissolved 443.11 mg/L tricalcium phosphate. The study also found that the capacity of the P1 was closely negative correlated to the pH of medium.

Key words: *Ensifer*; phosphate-solubilizing bacterium; phosphate solubilization capacity; microorganism fertilizer