

香蕉根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力

柯春亮^{1,2} 陈宇丰² 周登博² 黄绵佳^{1*} 张锡炎^{2*} 高祝芬²

(1. 海南大学 园艺园林学院 海南 海口 570228)

(2. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南 海口 571101)

摘要:【目的】以磷矿粉为难溶态磷,以期从香蕉根际土壤筛选出高效的解磷细菌。【方法】采用透明圈法和钼锑抗比色法分离筛选解磷细菌,通过形态学特征、生理生化试验结合 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树比对鉴定其种属,并利用单因素试验方法研究不同碳源、氮源及 C/N 比值(40:1、20:1 和 8:1)对菌株溶解磷矿粉能力的影响。研究不同菌株解磷能力和培养介质 pH 值的变化关系。【结果】分离具有解磷能力的细菌 8 株,筛选出具有代表性的 3 个菌株 B3-5-6、M-3-01 和 T1-4-01,初步鉴定菌株 B3-5-6 为嗜气芽孢杆菌(*Bacillus aerophilus*), M-3-01 为虫内生沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*), T1-4-01 为艾博丽肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)。B3-5-6 解磷能力与介质 pH 值之间存在线性负相关性($r=-0.949\ 66>0.735$),其相关性达到极显著水平;B3-5-6 在碳源为蔗糖、氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、C/N 为 40:1, M-3-01 在碳源为葡萄糖、氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、C/N 为 20:1, T1-4-01 在碳源为乳糖、氮源为蛋白胨、C/N 为 20:1 条件下解磷效果较好。解磷效果与初筛相比分别提高了 1.12、1.17、2.55 倍。【结论】不同的碳氮源、C/N 值会直接影响磷细菌的解磷能力;筛选出一株解磷能力与培养介质 pH 之间存在着极显著相关性的细菌,其解磷机理有待进一步研究。

关键词: 根际土壤, 解磷菌, 磷矿粉, 鉴定, 解磷能力

Isolation, identification and phosphate solubilization analysis of phosphate-solubilizing bacteria derived from banana rhizosphere soil

KE Chun-Liang^{1,2} CHEN Yu-Feng² ZHOU Deng-Bo² HUANG Mian-Jia^{1*}
ZHANG Xi-Yan^{2*} GAO Zhu-Fen²

(1. College of Horticulture and Landscape Architecture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

(2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: [Objective] In this study, ground phosphaterock was used as the undissolved phosphorus to select the high-efficient phosphate-solubilizing bacteria from the banana rhizosphere soil.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项项目(No. CARS-32)

*通讯作者: 黄绵佳: hmj886@163.com; 张锡炎: zxyan1981@163.com

收稿日期: 2014-09-11; 接受日期: 2015-01-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-01-23

[Methods] The methods of halo ring and Mo-Sb colorimetry were applied to isolate the phosphate-solubilizing bacteria. And a combination of morphologic characteristics identification, physiological and biochemical test, 16S rRNA gene sequences analysis and phylogenetic trees were employed to determine the genus of the phosphate-solubilizing bacteria. Various sources of carbon or nitrogen, the C/N value (40:1, 20:1, 8:1) and the pH value of culture medium which may affect the bacteria's ability to dissolve the ground phosphate rock were studied with the single factor experimental method. **[Results]** Eight strains of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) were isolated from the root soil, and three of them, B3-5-6, M-3-01, T1-4-01, were taken as representatives. The B3-5-6 was identified to be *Bacillus aerophilus*, M-3-01 *Serratia nematodiphila* and T1-4-01 *Enterobacter asburiae*. The phosphate-solubilizing ability of B3-5-6 and the pH of the culture medium was found to be linear negative correlated ($r = -0.949$ $66 > 0.735$) and reached the extremely significant level. For strain B3-5-6, the phosphate-solubilizing ability was better when the carbon source was sucrose, nitrogen source was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and C/N was 40:1. For strain T1-4-01, the phosphate-solubilizing ability was better when the carbon source was glucose, nitrogen source was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and C/N was 20:1. For strain M-3-01, the phosphate-solubilizing ability was better when the carbon source was glucose, nitrogen source was $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and C/N was 20:1 for strain T1-4-01, the phosphate-solubilizing ability was better when the carbon source was lactose, nitrogen source was peptone and C/N was 20:1. The phosphate-solubilizing ability was raised 1.12 fold, 1.17 fold and 2.55 fold, respectively. **[Conclusion]** Various sources of carbon or nitrogen, and C/N could affect the phosphate-solubilizing ability of different strains. The phosphate-solubilizing ability of B3-5-6 and the pH of the culture medium was found to be linear negative correlated ($r = -0.949$ $66 > 0.735$) and reached the extremely significant level. The phosphate-solubilizing mechanism of this strain needs to be furtherly investigated.

Keywords: Rhizosphere soil, Phosphate-solubilizing bacteria, Phosphaterock, Identification, P-solubility

作为植物生长必需的肥料三要素之一, 磷素以多种形式参与植物体内的生理生化代谢过程, 对植物的生长代谢起着重要的作用, 是农业生产的重要物质保障^[1]. 全世界 43% 的农业土壤缺磷, 中国 1.07 亿 hm^2 农田中大约有 2/3 严重缺磷^[2]. 耕作层土壤中又含有大量的矿物磷酸盐如磷矿, 植物很难直接吸收利用. 为满足当今农业生产的需要, 耕地大量施入可溶性磷肥, 成本高、污染大, 且使用时磷的固定现象严重, 破坏了土壤结构, 影响了作物的产量与品质. 磷矿粉直接应用于农业生产已有悠久历史, 但普通磷矿粉的磷素有效性低, 对作物的供磷能力有限, 在农业上的应用效果不佳^[3-5]. 研究证明, 土壤里存在能够将磷矿粉等植物难以吸收利用的磷酸盐转化为可吸收利用形态的微生物, 称为解磷菌或溶磷菌(Phosphate-solubilizing microorganism). 将其配合有机肥施入土壤, 可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^[6].

目前, 已报道具有解磷能力的微生物包括细菌、放线菌、真菌等. 解磷真菌、放线菌的解磷能力一般要强于细菌^[7], 但是, 解磷放线菌、真菌在种类和数量上远不如解磷细菌^[6]. 解磷菌的研究主要集中于以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为难溶磷源的解磷特性及在不同作物上的促生作用和抗病害作用, 以磷矿粉作为磷源的解磷特性研究较少. 不同的磷源研究中, 同一解磷菌株对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解效果最好, 对磷矿粉的效果最差, 而且对不同性质的磷矿粉的解磷效果也不一样^[8-9]. 不同种类的微生物, 不仅解磷能力存在巨大的差异, 而且解磷机理也可能不一样. 林启美等发现培养介质酸度升高是溶解磷矿粉的重要条件^[10], 两者之间存在显著的相关性^[11]. 培养基供给的 C 源、N 源和 C/N 值, 会影响到微生物的溶磷活性, 改变菌株的代谢过程^[12]. 也有学者认

为,微生物的解磷能力可能与它分泌有机酸类物质有关,也可能存在多个解磷机理^[13-14]。

本研究旨在香蕉根际土壤中分离筛选高效解磷矿粉的优良菌株,探讨碳源、氮源和 C/N 比值对菌株溶解磷矿粉能力的影响及其与培养介质 pH 值的变化关系,以期丰富微生物肥料生产菌株资源,并为在生产实践中筛选适合液体有机肥的载体提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

ST16R 型台式冷冻离心机,德国 Thermo 公司生产;TC-96/7/(a)型 PCR 仪,杭州博日生物技术有限公司生产;BG-gds Auto 型凝胶成像仪,北京百晶生物技术有限公司生产;UV1000 紫外可见分光光度计,上海天美科学仪器有限公司生产;FE20K 型实验室 pH 计,上海梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司生产。

DNA 提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司。

磷矿粉:产自江苏锦屏,柠檬酸浸提方法有效磷(P)含量为 2.3 g/kg,1:1 硝酸测定的全磷(P)为 237.5 g/kg。

1.2 供试样品及培养基

采自海南省临高县南宝镇(19°47'1"N, 109°51'17"E)、皇桐镇(19°49'58"N, 109°50'58"E)两个香蕉种植基地根际土壤,每个样品采用五点混样,为香蕉假茎直径 30 cm 以内,深度为 5–30 cm 的根际土壤。土壤样品采集后置于无菌封口袋中,准确标记,冰盒密封保存。

土壤样品带回实验室后,剔除植物残体、石砾等杂物,样品充分混匀分 2 份,于 4 °C 保存,分别用于土壤的养分组成测量和土壤解磷细菌的分离。

富集培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 3, NaCl

5,蒸馏水定容, pH 7.1–7.5。

无机磷基础培养基 A (g/L): 主要成分参考文献[7]细菌培养基 A, 磷源为 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 并与其他药品分开灭菌后混合。

无机磷基础培养基 B (g/L): 参考无机磷基础培养基 A, 用磷矿粉替换 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 磷矿粉与其他药品分开灭菌后混合。

种子培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母粉 5, NaCl 10, pH 7.0。

上述 3 种培养基加入体积 2%琼脂即制成固体培养基。

1.3 测定方法

1.3.1 土壤养分含量的测定: 按文献[15]方法, 采用常规化学分析方法^[15], 测定采集土壤 pH 值、有机质、全 N、有效 P 和速效 K。

1.3.2 初筛: 按文献[16]方法, 取土样 5 g, 研磨成粉状于富集培养基中培养过夜, 将样品取 10^{-6} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 、 10^{-3} 、 10^{-2} 释液 1 mL, 涂布于固体无机磷基础培养基 A 平板上, 每梯度涂 3 个平板, 37 °C 恒温倒置培养 72 h。挑取平板上具有明显区别的代表性菌落点接于固体无机磷基础培养基 A 平板上, 37 °C 培养 3–4 d 后观察解磷圈产生情况, 测量解磷圈直径(D)和菌落直径(d), 并计算溶解磷圈直径和菌落直径的比值(D/d)。

1.3.3 复筛: 挑取初筛菌株点种于液体基础培养基 B 上, 37 °C、200 r/min 摇床培养 7 d, 取上清液, 测有效磷含量, 发酵液 10 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用 0.45 μm 滤膜过滤。滤液用钼锑抗比色法^[17]测定, 分光光度值以不接种为空白对照, 进行可溶性磷含量测定。方法参考《水和废水监测分析方法》同时测不接种对照, 实验设 3 个重复, 观察菌株的解磷能力。

1.3.4 pH 值测定: 采用 pH 计测量。

1.3.5 解磷率计算公式:

$$\text{解磷率}(\%) = \frac{\text{培养液有效磷含量}(\text{mg/L}) - \text{对照有效磷含量}(\text{mg/L})}{\text{磷矿粉量}(\text{g/L}) \times \text{全磷含量}(\%) \times 1000} \times 100\%。$$

1.4 解磷细菌的鉴定

1.4.1 解磷细菌形态、生理生化特征: 参照《常见细菌系统鉴定手册》、《伯杰细菌鉴定手册》的方法进行。

1.4.2 16S rRNA 基因序列分析: 3 株代表性菌株 DNA 提取和 16S rRNA 基因序列分析采用 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 选取细菌 16S rRNA 通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')对菌株进行 PCR 扩增, 反应体系: 2×Taq master-mix 25 μL、10 mmol/L Forward primer 1 μL、10 mmol/L Reverse primer 1 μL、模板 1 μL, 补充 RNase-free 水至 50 μL。PCR 反应程序: 94 °C 3 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。扩增产物直接测序后, 测序所得序列通过 EzTaxon 在线比对服务(<http://www.ezbiocloud.net>)进行相关有效种相似性搜索, 并将相似率较高菌株的 16S rRNA 基因序列用 BioEdit 软件进行序列比对, 随后用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 进行菌株鉴定。

1.5 3 株解磷细菌的解磷能力、pH 值的测定

将分离的 3 株代表菌于液体种子培养基培养过夜, 按照 1%接种量接入基础培养基 B, 设计不接菌对照, 每个处理设 3 个重复, 37 °C、200 r/min 培养 13 d, 每隔 3 d 取样 10 mL, 检测培养液 pH 值, 并将样品进行可溶性磷含量测定, 方法见 1.3.3。

1.6 不同培养条件对解磷菌解磷能力的影响

1.6.1 碳源对菌株解磷能力的影响: 通过摇瓶实验, 选用无机磷基础培养基 B, 分别用葡萄糖、蔗糖、甘露醇、淀粉、甘油、乳糖作为碳源, 250 mL 三角瓶装液 100 mL, 每瓶接入 1%种子培养基培养的 3 株解磷细菌, 均设计不接菌对照, 37 °C、200 r/min 培养 7 d。发酵液进行可溶性磷含量测定。方法见 1.3.3。实验均设 3 个重复, 实验结果为 3 次重复的平均值。

1.6.2 氮源对菌株解磷能力的影响: 通过摇瓶实验, 选用无机磷基础培养基 B, 在优选碳源的基础上, 分别以乙酸铵、硝酸钾、尿素、蛋白胨、黄豆粉、硫酸铵作为氮源。方法参照 1.6.1。

1.6.3 C/N 对菌株解磷能力的影响: 通过摇瓶实验, 将各菌株筛选最优的碳氮源以 C/N 设计为 40:1、20:1、8:1 梯度。方法参照 1.6.1。

1.7 数据处理

用 SAS 6.12 软件对试验数据进行差异性、相关性分析, 采用 Microsoft Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 土壤因子特征

样地土壤理化性质的测定结果见表 1。从表 1 可以看出, 总体上两种地的肥力较好, 在有效 P、速效 K、有机质成分上, 南宝蕉园明显高于皇桐, 差异性极显著; pH 值和全 N 含量, 两蕉园差异不明显, 其中全 N 含量, 皇桐的比南宝蕉园高。

表 1 不同土壤样品主要理化性质

Table 1 Physical and chemical characteristics of different soil samples

| 样品编号 Sample No. | pH | 有机质 Organic matter (g/kg) | 全氮 Total N (g/kg) | 有效磷 Available P (mg/kg) | 速效钾 Available K (mg/kg) |
|--------------------|------------|------------------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|
| HT | 4.30±0.28a | 1.69±0.11b | 0.15±0a | 42.80±8.15b | 146.70±12.08b |
| NB | 4.80±0.36a | 2.39±0.07a | 0.10±0.01b | 298.17±19.76a | 299.10±11.69a |

注: HT: 皇桐土壤; NB: 南宝土壤。表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

Note: HT: Huangtong disease-infected soil; NB: Nanbao disease-infected soil. Data in the table is $\bar{x} \pm s$. Different lowercase letters in the same column show the significantly different at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test, respectively. The same below.

2.2 初筛结果

利用无机磷基础培养基 A，从香蕉根际土壤中初步筛选 8 株具有解磷能力的菌株，解磷圈如图 1 所示。解磷能力定性测量 D/d 值结果如表 2 所示。M-3-01、B3-5-6、M-4-20、B2-4-4 的 D 值均超过 10.0 mm，其中 B3-5-6 的 D 值最大，为 20.7 mm， D/d 值达 2.59；M-3-01 和 T1-4-01 的 D/d 值较之略小。

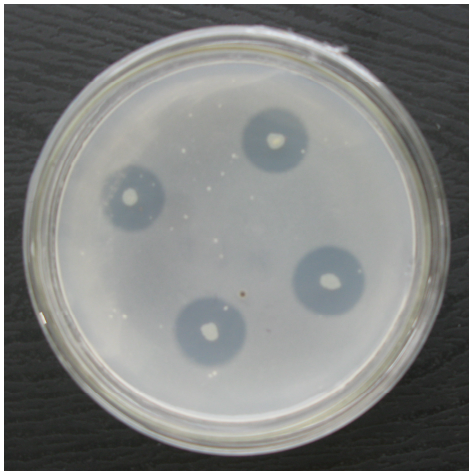


图 1 解磷圈
Figure 1 Observations of the halo ring

2.3 复筛结果

用液体无机磷分离培养基 B 对初筛获得的 8 个菌株进行培养，依据方法 1.3.3 测得解磷量大小，其中有 5 株解磷菌在纯化和多次复筛选过程中，解磷能力已经退化，最终筛选 3 株解磷能力稳定的解磷菌，按解磷能力顺序分别为 M-3-01>B3-5-6>T1-4-01。其中 M-3-01 解磷量达到 37.84 mg/L，M-3-01 解磷量为 37.85 mg/L，测定结果如表 3 所示。

2.4 菌株 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 的鉴定

2.4.1 形态特征及培养特征：在种子培养基上，菌株 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 生长良好，37℃ 恒温培养 2 d 菌落直径可达 3–7 mm。B3-5-6 菌落形态不规则，边缘不圆整、表面不光滑、呈白色且不透明、不产色素、革兰氏阳性、菌体杆状、好氧；M-3-01 菌落形态环状、边缘整齐、表面光滑湿润、呈淡黄色、不产色素、革兰氏阴性、兼性厌氧、杆状、周生鞭毛；T1-4-01 单菌落呈圆形、边缘整齐、表面光滑湿润、呈乳白色、不产色素、革兰氏阴性、好氧。

| 表 2 透明圈法测量菌株的解磷能力 | | | | | | | |
|---|------------------|-------------------|------------|--------------|------------------|-------------------|-------------|
| Table 2 The measurement of P-solubilizing ability of the bacterial strain by transparency circle method | | | | | | | |
| 菌株 Strain | 菌落直径 d (mm) | 透明圈直径 D (mm) | D/d | 菌株 Strain | 菌落直径 d (mm) | 透明圈直径 D (mm) | D/d |
| M-3-01 | 12.3±0.44a | 18.8±1.04b | 1.5±0.07b | B2-4 | 8.3±0.61c | 9.0±0.10d | 1.1±0.07e |
| B3-5-6 | 8.0±0.46c | 20.7±1.31a | 2.6±0.31a | B2-4-1 | 5.4±0.10e | 6.3±0.20f | 1.2±0.03cd |
| T1-4-01 | 6.5±0.20d | 9.1±0.70e | 1.4±0.13bc | B2-4-4 | 12.1±0.20ab | 15.8±0.17c | 1.3±0.01bcd |
| M-16 | 3.7±0.30f | 4.0±0.20g | 1.1±0.14d | M-4-20 | 11.6±0.30b | 12.3±0.30d | 1.1±0.05d |

| 表 3 复筛 3 株菌的解磷能力 | | | |
|---|------------|------------------------------------|--|
| Table 3 The P-solubilizing ability of the bacterial strain after second screening | | | |
| 菌株 Strain | pH | 解磷值 P-solubilizing valve (mg/L) | 解磷率 Phosphate-solubilizing rate (%) |
| M-3-01 | 3.39±0.16c | 37.85±2.07a | 3.18±0.21a |
| B3-5-6 | 3.66±0.06b | 21.22±0.64b | 1.78±0.06b |
| T1-4-01 | 5.71±0.11a | 4.56±0.47c | 0.38±0.05c |

2.4.2 生理生化特征: 解磷菌株 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 生理生化测定结果如表 4 所示。

2.4.3 分子生物学鉴定: 经过 PCR 产物序列测定, 3 株菌基因 PCR 产物序列长度 B3-5-6 为 1 350 bp, M-3-01 为 1 344 bp, T1-4-01 的序列长度是 1 354 bp; 将所获得的 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 菌株的 16S

rRNA 基因序列通过 EzTaxon 与 GenBank 中的序列进行基因序列对比。将与 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 菌株同源性最高、且已定名的模式菌的序列信息, 通过 MEGA 5.0 软件构建系统发育树, 如图 2 所示, 菌株 B3-5-6 序列与 *Bacillus aerophilus*、*Bacillus stratosphericus* 两菌株的相似性最高, 均达到 100%;

表 4 菌株 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 的生理生化指标
Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strain B3-5-6, M-3-01, T1-4-01

| 测定项目 Determination of the project | 测定结果 The determination results | | | 测定项目 Determination of the project | 测定结果 The determination results | | |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------|---------|---|-----------------------------------|--------|---------|
| | B3-5-6 | M-3-01 | T1-4-01 | | B3-5-6 | M-3-01 | T1-4-01 |
| H ₂ S | — | — | — | 纤维素酶 Cellulase | — | — | — |
| 淀粉水解 Amylolysis | — | — | — | 明胶液化 Gelatin liquefaction | — | + | — |
| 硝酸盐还原 Nitrate reduction | + | + | + | Tween 20 | — | + | — |
| NaCl 6% | + | + | + | Tween 80 | — | + | — |
| 8% | — | + | — | 接触酶试验 Catalase test | + | + | + |
| 10% | — | — | — | 丙二酸盐 C ₃ H ₃ NaO ₄ | + | — | — |
| MR | — | — | — | The optimal pH 6.0 | | | |
| V-P | — | + | — | 7.0 | + | | + |
| 碳源利用 C source utilization | | | | 8.0 | | + | |
| D-木糖 D-xylose | + | + | — | 氮源利用 N source utilization | | | |
| 甘露 Mannitol | + | + | + | L-精氨酸 L-arginine | + | + | + |
| α -乳糖 α -Lactose | + | + | + | L-羟基脯氨酸 L-hydroxyproline | + | + | + |
| 乳糖 Lactose | + | — | + | L-苯基丙氨酸 L-phenylalanine | + | — | + |
| 肌醇 Inositol | — | + | + | 缬氨酸 Valine | + | — | + |
| 木聚糖 Xylan | — | — | — | L-丝氨酸 L-serine | + | + | + |
| D-海藻糖 D-trehalose | + | + | + | L-半胱氨酸 L(+)-cysteine | + | + | — |
| 棉籽 Raffinose | + | + | + | 甘氨酸 Glycine | — | + | + |
| 鼠李糖 Rhamnose | + | + | + | 蛋氨酸 Methionine | + | + | + |
| D-山梨醇 D-sorbitol | + | + | + | 硫酸铵 (NH ₄) ₂ SO ₄ | + | + | — |
| L-阿拉伯糖 L-arabinose | + | — | + | 草酸铵 (NH ₄) ₂ C ₂ O ₄ | + | + | + |
| D-半乳糖 D-galactose | + | + | + | 氯化铵 NH ₄ Cl | + | + | + |
| 松三糖 Melezitose | + | — | — | 硝酸铵 (NH ₄)NO ₃ | — | + | + |
| D-果糖 D-fructose | + | + | + | 蔗糖 Sucrose | + | + | + |

Note: +: Positive (growth or reaction); -: Negative (unavailable no growth or no reaction).

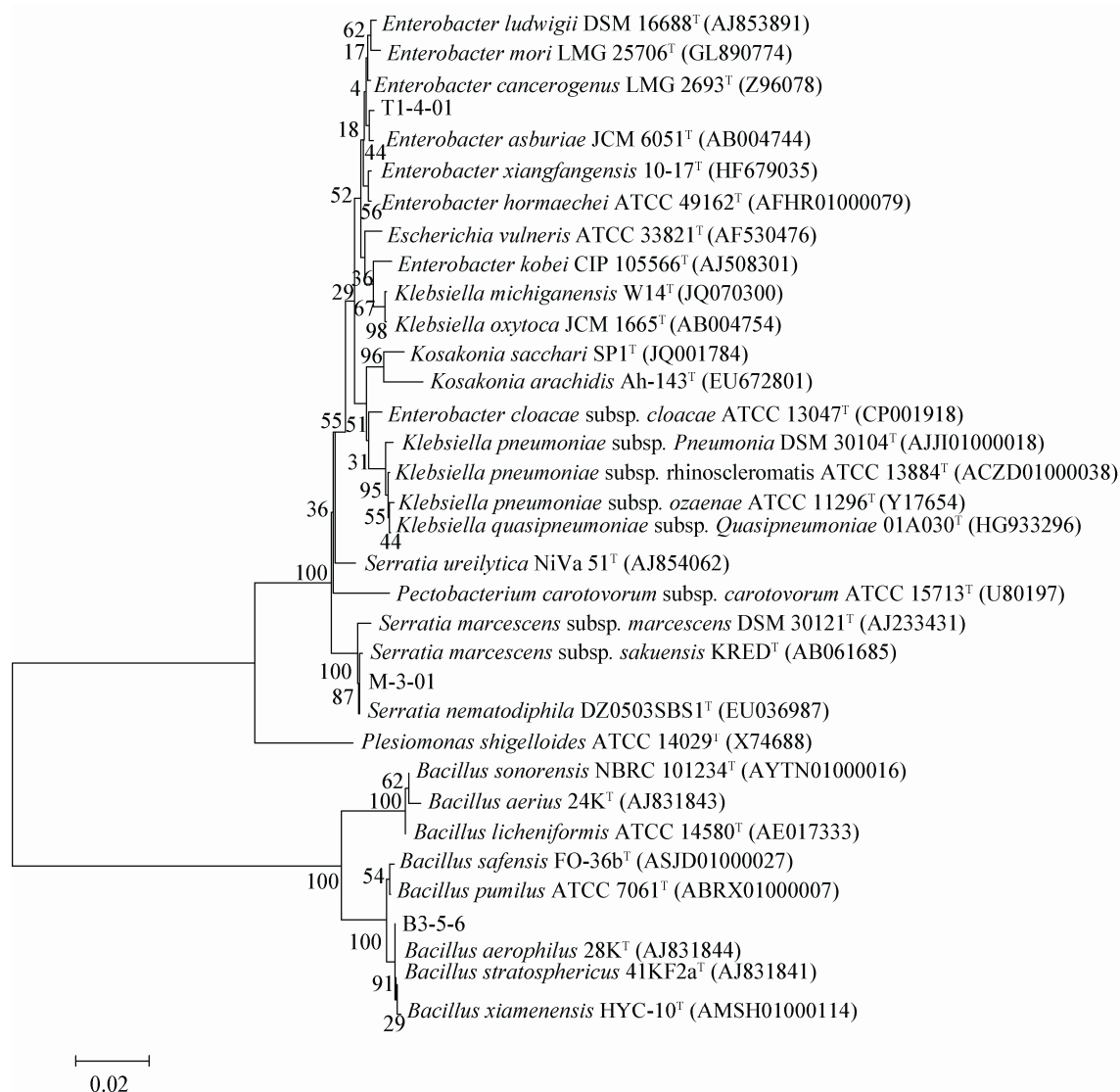


图2 基于16S rRNA基因序列构建的菌株T1-4-01、M-3-1、B3-5-6与相关菌株的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of strain T1-4-01, M-3-1, B3-5-6 and other related strains

Note: The sequences used in the analysis were obtained from the GenBank database (accession numbers are given in parentheses). The number at branch nodes are the percentage bootstrap support based on Neighbor-Joining analysis of 1 000 resample data sets. The scale bar corresponds to 0.02 substitutions per nucleotide position.

菌株M-3-01序列与*Serratia nematodiphila*标准株的相似性最高,达100%,且位于同一分支;T1-4-01序列与*Enterobacter asburiae*标准株的相似性最高,达99.54%,且处于同一分支。根据系统发育树相似性分析,结合形态、生理生化特征比对,并依据文献[18]对供试菌株进行鉴定,菌株B3-5-6为嗜气芽孢杆菌(*Bacillus aerophilus*),M-3-01为虫内生沙雷

氏菌(*Serratia nematodiphila*),T1-4-01为艾博丽肠杆菌(*Enterobacter asburiae*)。分别鉴定B3-5-6为嗜气芽孢杆菌,M-3-01为虫内生沙雷氏菌,T1-4-01为艾博丽肠杆菌。

2.5 解磷细菌的解磷能力、pH值的测定

2.5.1 3株解磷细菌在培养13 d内的培养介质pH变化:由图3可以看出,在液体无机磷培养基摇床

培养时, 3 株解磷菌随着培养时间的延长, pH 不同程度地先下降后上升的变化。其中, M-3-01 的 pH 值下降幅度明显, 12 h 时 pH 值已经下降到 4.39。培养时间为 72 h 时, M-3-01 的 pH 值到达最低值 3.57; T1-4-01 在培养 60 h 时, pH 达到最低值 5.81; B3-5-6 在培养时间为 120 h 时, pH 才达到最低值 3.64, 并一直维持在低位水平。

2.5.2 3 株解磷细菌在培养 13 d 内的解磷能力变化: 图 4 显示 3 株解磷菌在 0-312 h 培养时间内上清液有效磷含量的变化情况。可以看出, 3 株解磷菌的解磷趋势先上升后下降并趋于稳定。培养到 60-216 h 之间有效磷含量变化比较明显。培养时间为 60 h 时, M-3-01 有效磷量出现跃增, 在 72 h 时, 达到最大值 42.71 mg/L, 随后开始下降; 在培养时

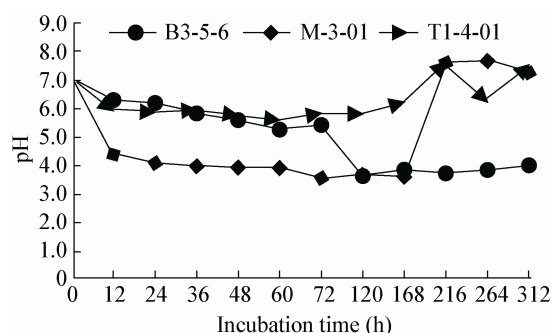


图 3 在无机磷液体培养时上清液 pH 的变化

Figure 3 The changes of the culture pH in the inorganic phosphorus liquid

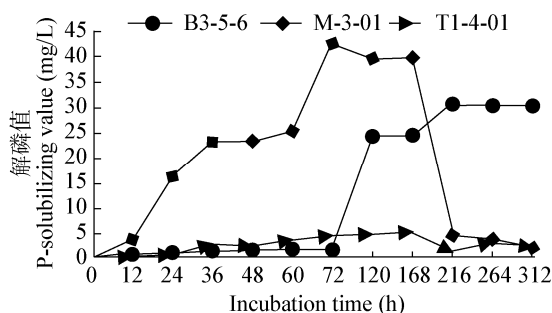


图 4 在无机磷液体培养时上清液速效磷的变化

Figure 4 The changes of the available phosphorus in the inorganic phosphorus liquid

间为 120 h 时, B3-5-6 上清液有效磷迅速增大, 在 216 h 时达到最大值 30.75 mg/L, 随后平缓下降; T1-4-01 随培养时间增加有效磷平缓增长, 在 168 h 时, 达到最大值 5.40 mg/L, 随后开始下降。后期可能碳源等营养物质的耗竭, 菌体繁殖受到抑制, 消耗部分溶解的有效磷, 维持菌体自身生长。

将 3 株解磷细菌培养溶液 pH 值和解磷能力做相关性分析, 结果发现菌株 B3-5-6 的 pH 值与解磷能力存在负相关, 其相关系数为 ($|r|=0.949\ 66>0.735$), 其相关性达到极显著水平。说明 B3-5-6 可能通过分泌有机酸降低溶液中的 pH, 达到溶解无机磷的效果; M-3-01 和 T1-4-01 的介质 pH 与解磷能力存在微弱的相关性, 但解磷机理是否与分泌有机酸有关还需进一步研究。

2.6 不同培养条件下 3 株解磷细菌解磷效果

解磷菌株对难溶态磷酸盐的解磷作用, 除了与菌株本身的遗传特性和难溶态磷酸盐的种类有关外, 还与培养基碳氮源的种类和比例有很大的关系。

2.6.1 碳源: 由图 5 可知, 3 株解磷细菌在不同碳源条件下解磷效果存在明显的差别。在 6 种不同的碳源中, 3 株解磷细菌解磷能力效果较强依次为: M-3-01: 葡萄糖>淀粉>乳糖; B3-5-6: 蔗糖>葡萄糖>乳糖; T1-4-01: 乳糖>蔗糖>甘油, 尽管三者在不同碳源条件下的解磷能力各不一样, 但从图 5 可明显地看出, 3 菌株均在葡萄糖、蔗糖、乳糖为碳源时的解磷效果较好, 表明该菌株对碳源的利用以单糖为主、双糖次之, 对多糖利用率较差; M-3-01 在碳源为葡萄糖时解磷量达 42.28 mg/L, B3-5-6 在蔗糖中解磷量为 33.26 mg/L, T1-4-01 在碳源为乳糖时解磷量为 17.98 mg/L, 其中它们在甘露醇上解磷效果最差。因此, M-3-01 选择葡萄糖, B3-5-6 选择蔗糖, T1-4-01 选择乳糖作为最佳碳源。

2.6.2 氮源: 由图 6 可知, 3 株解磷细菌在不同氮源条件解磷效果存在明显差异。在 6 种不同的氮源中, 3 株解磷细菌解磷能力效果依次为: M-3-01 硫酸铵>硝酸钾>黄豆粉; B3-5-6 硫酸铵>蛋白胨>

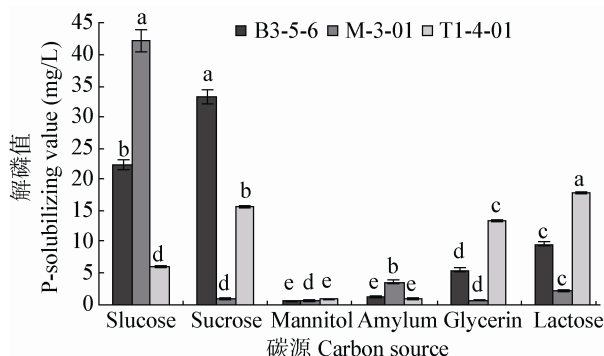


图5 碳源对磷细菌解磷能力的影响

Figure 5 Effect of different carbon sources on P-solubilizing ability of phosphorus solution bacteria

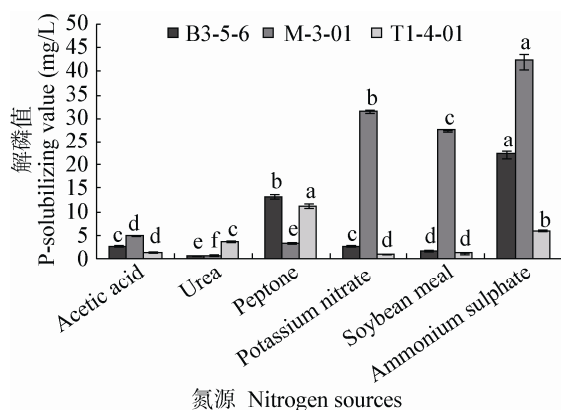


图6 氮源对磷细菌解磷能力的影响

Figure 6 Effect of different nitrogen sources on P-solubilizing ability of phosphorus solution bacteria

硝酸钾；T1-4-01 蛋白胨>硫酸铵>尿素，尽管三者在不同氮源条件下的解磷能力各不相同，但从图 6 可以看出，在氮源为硫酸铵、蛋白胨时，它们都存在明显的解磷效果。氮源为硫酸铵，M-3-01 的解磷量达 49.52 mg/L，B3-5-6 的解磷量达 22.23 mg/L；在氮源为蛋白胨，T1-4-01 的解磷量分别为 11.24 mg/L，其中，它们在尿素中解磷效果最差。因此，M-3-01 和 B3-5-6 选择硫酸铵，T1-4-01 选择蛋白胨作为最佳氮源。

2.6.3 不同 C/N: 3 株解磷菌在不同的 C/N 条件下解磷能力变化如图 7 所示，结果表明，解磷细菌 M-3-01、T1-4-01 的解磷能力随着 C/N 的减小，变

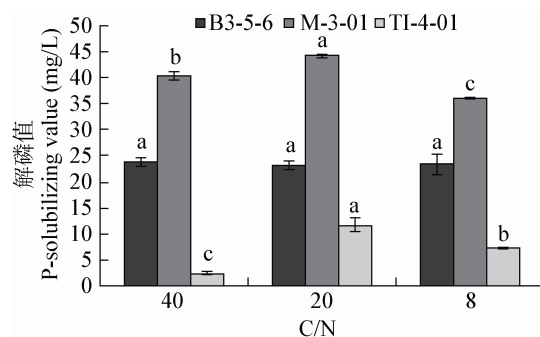


图7 C/N 对磷细菌解磷能力的影响

Figure 7 Effect of different the C/N on the P-solubilizing ability of phosphate-solubilizing bacteria

化先增加后减少；B3-5-6 随着不同的 C/N 解磷效果变化不明显。M-3-01 和 T1-4-01 在 C/N 为 20:1 时，其溶解量最高，分别为 44.20 mg/L 和 11.65 mg/L；B3-5-6 在 C/N 为 40:1 时，其溶解量最高，为 23.84 mg/L。

3 结论与讨论

微生物的解磷能力有 3 种测定方法^[19]：(1) 将解磷菌株在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为难溶性磷酸盐的固体培养基上培养，测定菌落周围产生的透明圈的大小。(2) 进行液体培养，测定培养液中可溶性磷的含量。(3) 进行土壤培养，测定其有效磷的含量。Kucey 等^[20]从根际土壤分离筛选无机磷细菌，纯化过程中，部分菌株会失去解磷活力。根据郝晶等^[21]的研究结果， D/d 和解磷能力的相关性也很差，菌株的 D 值、 D/d 和溶磷量之间并不总是呈正相关关系^[22]。本实验结果与这结论相一致(图 2)。实验采用定性透明圈法测定 D/d 值与定量液态钼锑抗比色法进行初筛和复筛，对 D/d 和解磷量进行综合分析，从香蕉根际土壤中分离获得 3 株稳定有效解磷细菌。因而，在生产应用上提供了筛选有效解磷细菌方法^[13]。

在菌株纯化过程中发现存在部分菌株的解磷能力下降，甚至消失。这可能是不同菌株之间存在类似互生的关系，而在菌株纯化后阻碍了这种相互促进的关系，从而导致了部分菌株解磷能力的下降和消失^[14]。因此，在未来菌肥中，添加有益微生物

共同使用, 会有更好的效果。

溶磷微生物的溶磷能力不仅取决于微生物本身的遗传特性, 还可能与磷矿粉的复杂结构及化学组成有关, 磷矿品位越低, 菌株溶解磷能力越弱^[8]。据文献显示, 高效磷细菌溶解不同特性的磷矿粉的平均溶解率基本在 1.20%–2.73% 之间^[7-9, 22-23]。以不同磷矿粉作为磷源, 林启美等^[23]用磷细菌摇瓶培养 7 d 后, 对磷矿粉(江苏锦屏)的解磷量为 24.50 mg/L, 解磷率为 1.67%; 4 株磷细菌培养液的磷含量最高达 43.34 mg/L, 解磷率为 1.52%^[24]。本实验中 3 株解磷矿粉能力较强的菌株, 初步进行培养基优化后, M-3-01、B3-5-6 菌株的培养基上清液含磷量明显高于对照, 解磷率分别是对照菌株的 1.90 和 1.06 倍。

相关研究表明: 溶磷能力的大小主要是由菌株的特性所决定的, 在不同的条件下, 菌株的解磷能力有很大的差异^[12]。此外, 同一株磷细菌在不同的碳氮源或 C/N 时表现的解磷能力并不一致^[25], 解磷细菌表现出的解磷能力与其所处环境有很大关系。本研究的结果表明, 复筛出的 3 株不同菌属的代表磷细菌, 解磷矿粉能力不相同, 尽管在不同的培养条件培养, 它们的解磷能力会有所变化, 但 T1-4-01 菌解磷能力还是处于较低水平, 此结果(表 3, 图 7)也说明了菌株的特性决定解磷能力大小。本研究发现, 3 株解磷菌中, 有些菌株(如 M-3-01)利用单糖效果比二糖效果好, 有些解磷菌(如 T1-4-01 和 B3-5-6)则相反。同一菌株在不同碳氮源及 C/N 的培养基上, 表现出解磷矿粉能力差异较大, 优化培养基后, 菌株 B3-5-6、M-3-01、T1-4-01 解磷矿粉能力分别提高了 1.12、1.17、2.55 倍。本实验中, 培养介质的 pH 与解磷量的关系研究中, 3 株解磷细菌两者都存在着一一定的负相关性, 其中菌株 B3-5-6 解磷能力与培养介质 pH 值的相关系数为 ($|r|=0.949\ 66>0.735$) 达到极显著水平, 这与席琳乔等^[26]的研究结果相一致。大量的研究^[27-29]发现, 随着培养时间的延长, 培养液 pH 逐渐降低, 解磷量逐渐增加。菌株的解磷量、培养液的 pH 存在负相关关系^[7]。但也有报道^[30]认为两者之间不存在线性

关系。本研究在综合分析 3 株解磷菌培养液 pH 与其解磷量时发现, 3 株磷细菌培养上清液 pH 与解磷量存在一定的相关性, 最大溶解磷量时, pH 值也最低。其中的解磷机理是否与分泌质子数量有关, 还需进一步研究。解磷机理现在有多种说法, 其中有在代谢过程中分泌质子, 使培养液的酸度升高而溶磷; 另一个机制是产生有机酸, 这些酸既能够降低 pH 值, 又可与铁、铝、钙、镁等离子结合, 从而使难溶性磷酸盐溶解^[30]。两种机理都会影响到上清液的 pH, 具有极高的相关性。解磷作用是否与培养液中质子的数量还是有机酸的数量有关, 还需做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Schroder JJ, Smit AL, Cordell D, et al. Improved phosphorus use efficiency in agriculture: a key requirement for its sustainable use[J]. *Chemosphere*, 2011, 84(6): 822-831
- [2] Qu JF, Dai JJ, Xu MG, et al. Advances on effects of long-term fertilization on soil phosphorus[J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2009, 29(3): 75-80 (in Chinese)
曲均峰, 戴建军, 徐明岗, 等. 长期施肥对土壤磷素影响研究进展[J]. *热带农业科学*, 2009, 29(3): 75-80
- [3] Jiang BP. Study on agricultural utilization of phosphorite in china[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1988, 21(4): 62-67 (in Chinese)
蒋柏藩. 中国磷矿农业利用的研究[J]. *中国农业科学*, 1988, 21(4): 62-67
- [4] Li QK. The theoretical basis of manurial effect of ground phosphorite[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1966, 17(2): 49-57 (in Chinese)
李庆远. 磷矿粉肥效问题的理论基础[J]. *科学通报*, 1966, 17(2): 49-57
- [5] Cevik U, Baltas H, Tabak A, et al. Radiological and chemical assessment of phosphate rocks in some countries[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 182(1/3): 531-535
- [6] He MX, Gao Y, Hu ZX, et al. Screening, identification, and phosphate-solubilizing capability of phosphate-solubilizing bacterial strain B25[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(1): 235-239 (in Chinese)
贺梦醒, 高毅, 胡正雪. 解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(1): 235-239
- [7] Lin QM, Zhao HY, Zhao XR. The characteristics of solubilizing rock phosphate by four isolates of bacteria and fungi[J]. *Microbiology China*, 2002, 29(6): 24-28 (in Chinese)
林启美, 赵海英, 赵小蓉. 4 株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性[J]. *微生物学通报*, 2002, 29(6): 24-28
- [8] Yang QH, Qiu HZ, Li YJ. The research on effect of soluble phosphorus with different properties of rock phosphate by Phosphobacteria[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2007, 38(6): 1240-1242 (in Chinese)

- 杨翠红, 邱慧珍, 李亚娟. 溶磷细菌对不同性质磷矿粉的溶磷效果研究[J]. 土壤通报, 2007, 38(6): 1240-1242
- [9] Zhong CQ, Huang WY. Effects and mechanisms of different-sourcing ground phosphorite solubilization by *Phosphobacteriap17*[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2004, 6(41): 931-936 (in Chinese)
钟传青, 黄为一. 磷细菌 P17对不同来源磷矿粉的溶磷作用及机制[J]. 土壤学报, 2004, 6(41): 931-936
- [10] Lin QM, Zhao XR, Sun YX, et al. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems[J]. *Soil and Environmental Sciences*, 2000, 9 (1): 34-37 (in Chinese)
林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 等. 四种不同生态环境土壤中解磷细菌的数量及种群分布[J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 34-37
- [11] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27: 257-263
- [12] Zhao XR, Lin QM, Li BG. Effect of C, N sources and C/N ratio on the solubilization of rock phosphate by some microorganisms[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2002, 8(2): 197-204 (in Chinese)
赵小蓉, 林启美, 李保国. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(2): 197-204
- [13] Asea PEA, Kucey RMN, Stewart JWB. Inorganic phosphate solubilization by two penicillium-species in solution culture and soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20: 459-464
- [14] Jiang LH, Liu ZH, Shi J, et al. Solubilization capacity of insoluble phosphates and its growth of biomass by the phosphate fungi (F2)[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(1): 42-46 (in Chinese)
江丽华, 刘兆辉, 石璟, 等. 真菌 F2的解磷能力及其生长动态研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(1): 42-46
- [15] Lu RK. *Soil Agricultural and Chemical Analysis*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1999: 260-513 (in Chinese)
鲁如坤. 土壤农业化学分析方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 260-513
- [16] Li FD, Yu ZN, He ZJ. *Microbiology Experimental*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1996: 90-92 (in Chinese)
李阜棣, 喻子牛, 何绍江. 微生物学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 90-92
- [17] SEPA. *Method Establishment of Soil Phosphobacteria Isolation and Screening*[M]. Beijing: China Environmental Press, 2002: 243-250 (in Chinese)
国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 北京: 中国环境出版社, 2002: 243-250
- [18] Dong XZ, Cai MY. *Manual on Systematic Identification of Common Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2001: 43-191 (in Chinese)
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: 43-191
- [19] Yu XM, Shen QB, Li BL, et al. Method establishment of soil phosphobacteria isolation and screening[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008, 29(3): 321-325 (in Chinese)
余贤美, 沈奇宾, 李炳龙, 等. 土壤解磷细菌分离和筛选方法的建立[J]. 热带作物学报, 2008, 29(3): 321-325
- [20] Kucey RMN. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 1983, 63: 671-678
- [21] Hao J, Hong JP, Liu B, et al. Isolation, screening and combination of highly-effective phosphorus solubilizing bacterial strains in calcareous soil[J]. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2006, 12(3): 404-408 (in Chinese)
郝晶, 洪坚平, 刘冰, 等. 石灰性土壤中高效解磷细菌菌株的分离、筛选及组合[J]. 应用与环境生物学报, 2006, 12(3): 404-408
- [22] Hu XF, Guo JY, Zhang N, et al. Screening of a phosphate solubilizing and disease inhibiting bacteria strain and studies on its P-solubilizing characteristics[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(11): 2253-2260 (in Chinese)
胡晓峰, 郭晋云, 张楠, 等. 一株溶磷抑病细菌的筛选及其溶磷特性[J]. 中国农业科学, 2010, 43(11): 2253-2260
- [23] Lin QM, Zhao HY, Zhao XR, et al. Rock phosphates solubilization of some microorganisms[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(10): 1232-1235 (in Chinese)
林启美, 赵海英, 赵小蓉, 等. 溶磷微生物对不同磷矿粉的溶解能力[J]. 中国农业科学, 2002, 35(10): 1232-1235
- [24] Lin QM, Wang H, Zhao XR. Capacity of some bacteria and fungi in dissolving phosphate rock[J]. *Microbiology China*, 2001, 28(2): 26-30 (in Chinese)
林启美, 王华, 赵小蓉. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 26-30
- [25] Yu WB, Yang XM, Shen QR, et al. Influence of carbon and nitrogen sources on phosphate solubilization by K3 strain[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34(5): 81-85 (in Chinese)
虞伟斌, 杨兴明, 沈其荣, 等. 不同碳氮源对解磷菌 K3溶磷效果的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(5): 81-85
- [26] Xi LQ, Wang JF, Ma JP. Determination for solubilizing phosphate ability and organic acids secretion of phosphobacteria in the cotton rhizosphere[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(5): 70-74 (in Chinese)
席琳乔, 王静芳, 马金萍. 棉花根际解磷菌的解磷能力和分泌有机酸的初步测定[J]. 微生物学杂志, 2007, 27(5): 70-74
- [27] Zhu PM, Yang XM, Xu YC, et al. High effective phosphate-solubilizing bacteria there isolation and promoting effect on corn seedling growth[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(1): 107-112 (in Chinese)
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
- [28] Tao T, Ye M, Liu D, et al. On isolation and identification of inorganic phosphobacteria and its phosphate-solubilizing capacity[J]. *Journal of Hefei University of Technology*, 2011, 34(2): 304-306 (in Chinese)
陶涛, 叶明, 刘东, 等. 无机解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力研究[J]. 合肥工业大学学报, 2011, 34(2): 304-306
- [29] Cheng GC, He ZL, Wang YJ. Impact of pH on microbial biomass carbon and microbial phosphorus in red soils[J]. *Pedosphere*, 2004, 14(1): 9-15
- [30] Chi RA, Qiao CQ, Gao H, et al. Dynamic research on ground phosphorite solubilization by kinds of phosphobacteria[J]. *Industrial Minerals and Processing*, 2005(7): 4-7 (in Chinese)
池汝安, 肖春桥, 高洪, 等. 几种微生物溶解磷矿粉的动态研究[J]. 化工矿物与加工, 2005(7): 4-7