

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2018.04.005

核桃根际溶磷菌的筛选

李诗娟¹, 宋祖文³, 王丽^{1*}, 黄仲华¹, 盛玉珍¹, 金开铭², 张玲², 徐磊²

(1 四川省林业科学院, 四川 成都 610081; 2 喜德县林业局, 四川 喜德 616750;

3. 四川林业宣传中心, 四川 成都 610000)

摘要:为获得高效的溶磷菌,用于菌肥生产。通过 Pikovskava 无机解磷培养基从核桃土壤里筛选出溶磷菌,通过液体发酵试验确定其溶磷活力,利用分子生物学方法对较高活力的溶磷菌进行分子鉴定;通过单因素试验,比较该溶磷菌与两种菌肥溶磷菌在不同发酵液配方及发酵条件下的发酵活力。分离得到的高效溶磷菌为芽孢菌属,适宜初始 pH 值范围为 5~9,适宜温度范围为 16℃~40℃,适宜氮源有硫酸铵、氯化铵和草酸铵、蛋白胨,适宜碳源有草酸铵、蔗糖、甘油;高浓度 Fe³⁺、Mn²⁺ 对其活力有一定的促进作用,而 Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺ 会抑制其解磷。在不同发酵液配方及发酵条件下,该溶磷菌溶磷能力优于菌肥 2 溶磷菌;在不同发酵条件下,该溶磷菌溶磷能力稳定性优于菌肥 1 溶磷菌。该溶磷菌添加到菌肥中有一定的市场潜力。

关键词:溶磷菌;溶磷能力;优化

中图分类号:S664.1

文献标识码:A

文章编号:1003-5508(2018)04-0022-04

Selection of Rhizosphere Phosphate-solubilizing Bacteria for *Juglans regia*

LI Shi-juan¹ SONG Zu-wen³ WANG Li^{1*} HUANG Zhong-hua¹ SHENG Yu-zhen¹

JIN Kai-ming² ZHANG Ling² XU Lei²

(1. Sichuan Academy of forestry, Chengdu 610081, China; 2. Forestry Bureau of Xide County, Xide 616750, China;

3. Sichuan Forestry Propaganda Center Chengdu 61000, China)

Abstract: It aimed to gain highly efficient phosphate-solubilizing microorganisms. Phosphate-solubilizing bacteria were isolated in advantage of Pikovskava phosphate dissolving medium. Liquid fermentation experiments showed the phosphate-solubilizing activity, molecular biological methods identified the microbial functional community with higher activity. By single factor test, the vitality of different strains were compared under different formulas and the fermentation conditions of culture medium. *Bacillus* sp. was the phosphate-solubilizing bacterium with higher efficiency. The optimum medium was as follows: suitable initial pH of 5~9, optimum temperature range of 16℃~40℃, ammonium sulphate, ammonium chloride and ammonium oxalate, peptone for suitable nitrogen source, ammonium oxalate, sucrose, glycerol for suitable carbon source. High concentration of Fe³⁺ and Mn²⁺ had a certain role in promoting its vitality, but Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ would hold the phosphate solubilizing. In different formulations and fermentation conditions, Its phosphate solubilizing ability was better than that of microbial fertilizer 2. In different fer-

收稿日期:2018-04-08

基金项目:四川林业厅项目

作者简介:李诗娟(1987-),女,四川省岳池人,理学硕士,林业工程师研究方向为土壤微生物学,e-mail:706454547@qq.com。

通讯作者:王丽,副研究员,e-mail:45245772@qq.com。

mentation conditions, the stability of phosphate solubilizing ability was better than that of microbial fertilizer 1. It would give a certain market potential for the phosphate-solubilizing bacteria added to the fertilizer.

Key words: Phosphate-solubilizing bacteria, Phosphate-solubilizing ability, Optimization

随着现代农业技术的发展,农业生产面临着化肥长期使用,甚至过量使用,导致农产品品质下降、肥料利用率低、土壤板结和地下水污染等问题。因此,国内外都在积极寻求发展绿色农业,提倡生产安全、无公害绿色食品。绿色食品生产过程中,要求不用或少用化学肥料。而微生物菌肥是利用微生物生命活动导致作物获得特定肥料效应的一种肥料,具有营养全面、肥效持久、可改善作物品质、提高肥料利用率、改良土壤结构等特点^[1,2]。因此微生物肥料是实行绿色农业的重要技术保证。

微生物功能菌作为微生物肥料的核心部分,是微生物肥料生产的关键技术。溶磷菌是一种重要的土壤功能菌,主要为农作物的生长发育提供磷元素,植物细胞中细胞膜主要由脂类、蛋白质和糖类组成,其中脂类约为 50%,而脂类的主要成分为磷脂和胆固醇,由此可见磷元素对细胞的生长和增殖起重要作用;磷还参与植物生命过程的光合作用,糖和淀粉的利用和能量的传递过程。磷肥还能促进植物苗期根系的生长,使植物提早成熟。植物在结果时,磷大量转移到籽粒中,使得籽粒饱满。农作物缺磷时生长缓慢、矮小瘦弱、直立、分枝少,叶小易脱落;色泽一般,呈暗绿或灰绿色,叶缘及叶柄常出现紫红色;根系发育不良,成熟延迟,产量和品质降低。我国有约 75% 的土壤缺磷,且土壤中 95% 以上的磷都难以被植物直接吸收^[3]。从 20 世纪 70 年代我国开始大量使用磷肥,然而约 70% 的磷肥转化为 Ca-P、Fe-P 等难以被植物吸收利用的形态固定在土壤中^[4,5],溶磷菌可以将土壤中的固定态磷转化成有效磷,因此合理利用溶磷菌与开发微生物菌肥对提高作物产量、减少化肥使用、降低环境污染有巨大前景。

1 实验材料

土壤样品:取自四川广元市朝天区蒲家乡河坝场村核桃种植园的核桃根际土壤。

培养基: Pikovskava 无机解磷培养基^[6]: 葡萄糖 10.0 g、酵母膏 0.4 g、(NH₄)₂SO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.3 g、MnSO₄ · 4H₂O 0.03 g、Ca₃(PO₄)₂ 10 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0 ~

7.5, 121 °C 灭菌 19 min。

菌株: 对照菌株: 荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) Asl. 0867 由中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 提供。

菌肥菌剂: 从广州微元生物科技有限公司购买溶磷菌菌剂分离得到菌肥 1 溶磷菌, 从成都盖尔盖司生物科技有限公司购买的菌肥中分离出一株溶磷菌: 菌肥 2 溶磷菌。

实验仪器: 生物安全柜, 生化培养箱, 高速梯度 PCR 仪, 恒温培养箱, 分光光度计等。

2 实验方法

(1) 菌种筛选: 以 Pikovskava 无机解磷培养基为选择培养基, 采用平板分离和划线纯化, 从土壤和菌肥菌剂中分离得到溶磷菌。

(2) 溶磷菌活力测定: 在 100 mL 三角瓶中加入 30 mL Pikovskava 无机解磷培养基, 121 °C 灭菌 19 min, 无菌操作, 每瓶接入待测菌种 2 mL, 并作一不接菌的空白对照, 均于 30 °C, 160 r · min⁻¹ 摇床上振荡培养 7 d 后, 取上清液测有效磷。

(3) 菌种鉴定: 鉴于分离得到的较高效溶磷菌和菌肥溶磷菌均为细菌, 采用 16S rRNA/rDNA 序列测序做分子鉴定, 用天根细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 DNA, 细菌用 16S rDNA 扩增引物 (正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 1492R: 5'-TACGGTTACCTGTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 反应, PCR 产物送成都擎科梓熙生物技术有限公司纯化测序。将所获得的序列在国际核酸数据库 (NCBI) 中进行同源序列的搜索, 比较供试菌株与已知菌种模式菌株相应序列的相似度, 对其做出鉴定。

(4) 溶磷条件优化试验。以 Pikovskava 无机解磷培养基为发酵培养基, 对发酵温度和初始 pH 值进行优化, ①确定适宜温度范围: 将接种后的发酵液分别置于 16 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C 条件下, 转速 160 r · min⁻¹ 发酵 7 d, 测发酵液有效磷含量; ②确定适宜初始 pH 值的范围: 分别配置 pH 值为 5、6、7、8、9、10 的 Pikovskava 无机解磷培养基,

接种后置于 30 ℃, 转速 160 r · min⁻¹ 条件下发酵 7 d, 测发酵液有效磷含量。

(5) 培养基配方优化试验。①适宜碳源选择: 分别用乙酸铵、草酸铵、淀粉、甘露醇、蔗糖、麸皮、甘油代替原培养基中的葡萄糖, 接种和发酵条件不变, 测定其溶磷能力; ②适宜氮源选择: 分别用氯化铵 0.405 g · L⁻¹、草酸铵 0.538 g · L⁻¹、尿素 0.227 g · L⁻¹、蛋白胨 0.884 g · L⁻¹、硝酸铵 0.364 g · L⁻¹ 代替原培养基中的硫酸铵, 发酵 5 d, 接种和其他发酵条件不变, 测定其溶磷能力; ③金属离子对发酵的影响: 在 Pikovskava 解无机磷液体培养基中分别加入 CuSO₄ · 5H₂O 6.250 g · L⁻¹、ZnSO₄ · 7H₂O 7.175 g · L⁻¹、Fe₂(SO₄)₃ 9.965 g · L⁻¹、CaCl₂ 2.775 g · L⁻¹、MnSO₄ · H₂O 4.225 g · L⁻¹、NiSO₄ · 6H₂O

6.571 g · L⁻¹ 的不同液体培养基, 使其中金属离子 Cu²⁺、Zn²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺ 浓度均为 0.025 mol · L⁻¹, 调节各培养基的 pH 值为 7.0, 接种和发酵条件不变, 测定其溶磷能力。

3 结果与分析

3.1 溶磷菌分离纯化及活性测定

利用 Pikovskava 无机解磷平板培养基, 从不同的土壤样品中筛选纯化出 9 株溶磷微生物, 其中 6 株细菌, 编号分别为 Rpx1、Rpx2、Rpx3、Rpx4、Rpx5、Rpx6; 3 株真菌, 编号为 Rpm7、Rpm8、Rpm9; 通过液体发酵试验, 测定它们的溶磷活力, 结果见表 1。

表 1 溶磷菌活力比较

菌株编号	培养体积 (mL)	发酵液最终 pH 值	分取倍数	700 nm 处吸光度 (Abs)	测读液含磷量 (mg · L ⁻¹)	发酵液溶磷量 (mg · L ⁻¹)	溶磷率 (%)
As1.0867	30.6	5.66	500	0.099	0.1944	97.21	4.42
Rpx1	30.7	6.60	500	0.078	0.1547	77.35	3.51
Rpx2	30.5	4.63	500	0.048	0.0966	48.29	2.19
Rpx3	29.8	5.61	50	0.020	0.0414	2.07	0.09
Rpx4	30.3	4.72	500	0.117	0.2303	115.13	5.23
Rpx5	30.3	4.07	500	0.053	0.1063	53.14	2.41
Rpx6	30.0	4.61	500	0.072	0.1431	71.54	3.25
Rpm7	28.8	5.96	50	0.050	0.1005	5.02	0.23
Rpm8	31.6	5.82	50	0.012	0.0259	1.29	0.06
Rpm9	31.9	4.67	500	0.089	0.1760	88.01	4.00
菌肥 1 溶磷菌	30.6	4.47	500	0.149	0.2913	145.64	6.62
菌肥 2 溶磷菌	30.3	4.71	500	0.052	0.1034	51.68	2.35

注: 磷校准曲线: $c = 1.9372 * A + 0.0036$ $R^2 = 0.9999$ A: 700 nm 处样品吸光度

结果表明: Rpx4 菌株溶磷能力比较高, 溶磷率达到 5.23%; 而对照菌株 As1.0867 溶磷率只有 4.42%, 菌肥 1、2 溶磷率分别为 6.62%、2.35%。

3.2 溶磷菌菌种鉴定

分别以 Rpx4 和菌肥 1、2 溶磷菌的 DNA 为模板, 用 16S rDNA PCR 引物做 PCR 扩增, 扩增产物直接送到成都擎科纯化测序, 利用 NCBI 中 BLAST 软件对测序结果进行同源性比对搜索。结果表明: Rpx4 与 *Bacillus* sp. (基因登录号: KF482860.1) 的遗传性最近, 同源性为 99%; 菌肥 1 溶磷菌与 *Bacillus* sp. (基因登录号: GQ169805.1) 的遗传性最近, 同源性为 99%; 菌肥 2 溶磷菌与 *Bacillus* sp. (基因登录号: KU986677.1) 的遗传性最近, 同源性为 99%; 由此可见 3 种溶磷菌都是芽孢菌属。

3.3 溶磷条件优化试验结果

从图 1 可以看出随着 pH 值的不断升高, 溶磷菌的溶磷能力不断下降, 其中菌肥 1、菌肥 2 溶磷菌下降特别明显, 而 Rpx4 下降最慢, 溶磷能力稳定性最好, 其适宜 pH 值范围为 5~9, 最适 pH 值为 6。

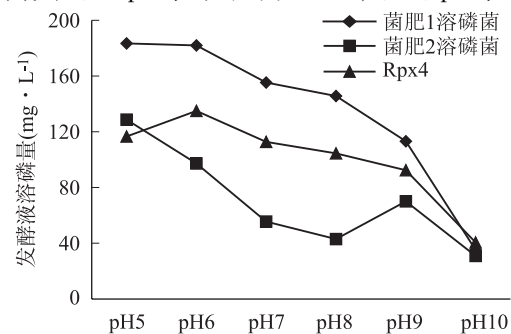


图 1 不同 pH 值对 3 种溶磷菌解磷能力的影响

注: 图 1~5 中, 纵坐标均表示发酵后发酵液中含磷量, 单位为 mg · L⁻¹

从图 2 可以看出,3 种溶磷菌均在 16 ℃ ~ 40 ℃ 时,溶磷能力稳定变化不大,最适温度出现在 25 ℃ ~ 35 ℃ 之间。

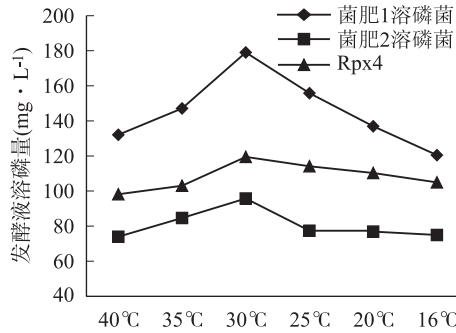


图 2 不同温度对 3 种溶磷菌解磷能力的影响

3.4 培养基配方优化试验结果

碳源:从图 3 可以看出,Rpx4 和菌肥 2 最佳碳源为草酸铵,菌肥 1 最佳碳源为甘露醇。对 3 种溶磷菌而言,草酸铵、蔗糖、甘油都是较好的碳源。
氮源:从图 4 可以看出,菌肥 1 和菌肥 2 最佳氮源为氯化铵,Rpx4 最佳氮源为草酸铵。对 3 种溶磷菌而言,氯化铵、草酸铵都是较好的氮源。
金属离子:从图 5 可以看出,Fe³⁺、Mn²⁺ 对 Rpx4 溶磷有促进作用, Mn²⁺、Zn²⁺ 对菌肥 1 溶磷菌影响不显著,Fe³⁺、

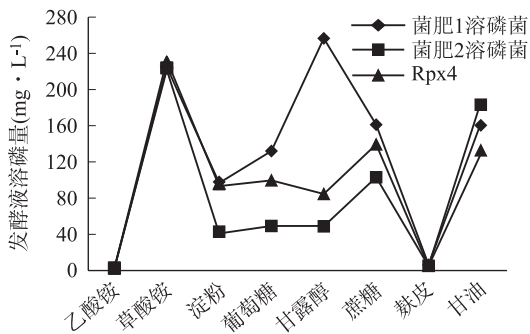


图 3 不同碳源对 3 种溶磷菌解磷能力的影响

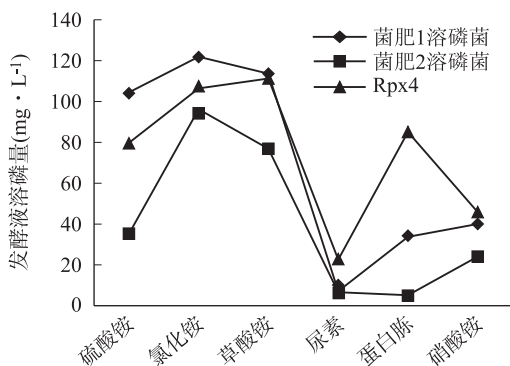


图 4 不同氮源对 3 种溶磷菌解磷能力的影响

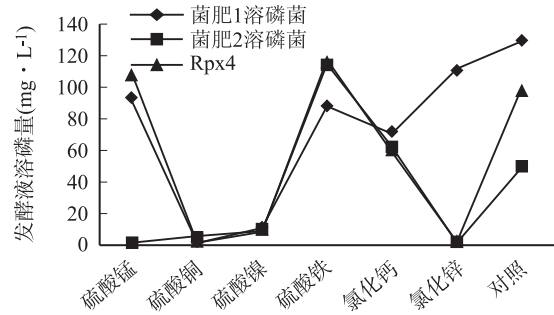


图 5 不同金属离子对 3 种溶磷菌解磷能力的影响

Ca²⁺ 对菌肥 2 溶磷菌有促进作用,而 Cu²⁺、Ni²⁺ 会抑制三种溶磷菌解磷。

4 讨论与结论

本研究从核桃林地土壤中分离得到一株高效溶磷菌 Rpx4,通过 16S rDNA 鉴定为芽孢杆菌,目前芽孢杆菌的溶磷效果报道比较多,而且芽孢杆菌抗逆性强、能长时间存储,是比较好的一种菌肥菌种。有关细菌溶磷条件优化多从碳源、氮源、pH 值、温度等方面进行研究^[7,8,9],本研究通过摇瓶发酵发现不同温度、初始 pH 值、碳源、氮源和金属离子对 Rpx4 的溶磷能力有很大影响。其适宜初始 pH 值范围为 5 ~ 9,适宜温度范围为 16 ℃ ~ 40 ℃,适宜氮源有硫酸铵、氯化铵、草酸铵、蛋白胨,适宜碳源有草酸铵、蔗糖、甘油,高浓度 Fe³⁺、Mn²⁺ 对其活力有一定的促进作用,而 Cu²⁺、Ni²⁺、Zn²⁺ 会抑制其解磷。通过比较不同发酵液配方及发酵条件下,Rpx4 与两种菌肥中的溶磷菌解磷能力得出,Rpx4 明显优于肥料 2 溶磷菌,在温度 16 ℃ ~ 40 ℃、初始 pH 值为 5 ~ 9 时,其溶磷能力低于肥料 1 溶磷菌,但其溶磷能力稳定性最好,且对蛋白胨、硝酸铵两种氮源的适应性也高于肥料 1 溶磷菌,该溶磷菌添加到菌肥中有一定的市场潜力。另外,有报道表明一些溶磷菌具有一定的促生效益,如提高种子的发芽率及发芽指数,增加植物干重、株高及对磷的吸收的累积量等^[10,11]。本研究只进行了溶磷优化条件试验,要真正应用到微生物菌肥工业化生产中还需进一步完善促生效益试验和生产工艺研究。

参考文献:

[1] 姜瑞波,张晓霞. 微生物肥料的种类及其应用[J]. 磷肥与复肥,2002,17(3):10~11. (下转第 53 页)

(2)在印度黄檀扦插繁殖过程中,应尽量选择健康无病害的枝条,扦插前应做好土壤消毒,且应于扦插前 30 min 用水浇透插床,使得扦插过程中避免基质太硬而导致插条扦插过程中的树皮损伤。如果在雨季扦插则应使用高床,防止因水涝影响生根并导致烂根和烂枝等,并定期喷施多菌灵或甲基托布津等杀菌剂防止霉菌等滋生影响插条生根;试验中部分已经产生了愈伤组织,但未能生根的插条,后期还有可能生根,也有可能未生根就死亡,如 30 a、40 a、50 a 之后的生根状况还需进一步深入研究。

(3)试验中的 6BA 处理和 NAA25 mg · L⁻¹ 处理没有发现生根现象也可能是由于试验的其他不可控因素导致,如插条来源、插条差异大小上会有一些差异,且在插条剪取操作过程中,由于技术娴熟程度也会造成扦插断面的不平整或开裂等,其他不可控因素有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志第四十卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] Rajnish K. Vakshasya, Om P. Rajora and Mahendra S. Rawat . Seed and seedling traits of *Dalbergia sissoo* Roxb; seed source variation studies among 10 sources in India [J]. *Forest Ecology and Management*, 48 (1992) 265 ~ 275.
- [3] 普玉明. 南沙镇印度黄檀产业培植 [J]. 林业调查规划, 2013, 38(3): 92 ~ 95.
- [4] 张铁成. 吡啶丙酸、吡啶丁酸和苯乙酸对印度黄檀插穗生根效果的比较研究 [J]. 上海农业科技, 1986.
- [5] 张远兵, 刘爱荣, 蔡为青, 等. 几种不同基质对三角梅扦插生长的影响 [J]. 中国林副特产, 2003, 64(1).
- [6] 唐勇, 陈艳彬. 印度黄檀的丰产栽培技术 [J]. 四川林业科技, 2012, (3): 121 ~ 122.
- [7] 谢志南, 赖瑞云, 林丽仙, 等. 三角梅扦插生根过程解剖学观察 [J]. 闽西职业技术学院学报, 2008, 10(3).
- [8] 杨健全. 印度黄檀的种植和管护 [J]. 云南林业, 2015, (1): 67 ~ 68.
- [9] 石雷, 梁英扬, 邓疆. 印度黄檀适生性的气候因子研究 [J]. 林业科学研究, 2010, 23(2): 191 ~ 194.
- [10] 石雷, 梁英扬, 邓疆. 印度黄檀引种试验研究 [J]. 西南农业学报, 2010, 23(2).
- [11] 陈艳彬, 沙万友. 印度黄檀引种试验初报 [J]. 四川林业科技, 2015, 36(1).
- [12] 唐勇, 陈艳彬. 印度黄檀的丰产栽培技术 [J]. 四川林业科技, 2012, 33(3).
- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志第四十卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.
- [2] Bagyaraj D J, Krishnaraj P U, Khanuja S P S. Mineral phosphate solubilization: Agronomic implications, mechanism and molecular genetics, *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2000, 66(2): 69 ~ 82.
- [3] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 玉米根际与非根际解磷细菌的分布特点 [J]. 生态学杂志, 2001, 20(6): 62 ~ 64.
- [4] Vig A C, DeV G. Phosphoms adsorption characteristics of some acid and alkaline soils, *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 1984, 32(2): 235 ~ 239.
- [5] 林启美, 王华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探. 2001, 28(2): 27.
- [6] 王舒, 张林平, 张扬, 等. 红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、鉴定及其解磷能力 [J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 409 ~ 416.
- [7] 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.
- [8] 刘云华, 吴毅歆, 杨绍聪, 等. 洋葱伯克霍尔德溶磷菌的筛选和溶磷培养条件优化 [J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(3): 78 ~ 82.
- [9] 邵锴, 邱业先, 徐婧. 高效溶磷菌的筛选、鉴定及其溶磷特性 [J]. 江苏农业科学, 2017, 45(8): 253 ~ 257.
- [10] 王誉瑶, 韦中, 徐阳春, 等. 溶磷菌株组合的溶磷效应及对玉米生长的影响 [J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(1): 262 ~ 268.

(上接第 25 页)

- [2] 沈其荣, 谭金芳, 钱晓晴. 土壤肥料科学通论 [M]. 北京: 高等教育出版社, 209 ~ 213.
- [3] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫, 等. 玉米根际与非根际解磷细菌的分布特点 [J]. 生态学杂志, 2001, 20(6): 62 ~ 64.
- [4] Vig A C, DeV G. Phosphoms adsorption characteristics of some acid and alkaline soils, *Journal of the Indian Society of Soil Science*, 1984, 32(2): 235 ~ 239.
- [5] Bagyaraj D J, Krishnaraj P U, Khanuja S P S. Mineral phosphate solubilization: Agronomic implications, mechanism and molecular genetics, *Proceedings of the Indian National Science Academy*, 2000, 66(2): 69 ~ 82.
- [6] 林启美, 王华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探. 2001, 28(2): 27.