

大豆根际高效溶磷菌株的分离及溶磷能力分析

王浩, 姜妍, 刘伟, 李远明, 于佳, 王绍东

(东北农业大学 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150028)

摘要:采用无机磷合成培养基从大豆根际分离到223株细菌,其中能够产生明显溶磷圈的菌株47株,且在土壤中添加1% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 有利于筛选获得具有高效溶磷能力的菌株。对菌株的溶磷量进行测定,测得菌株的溶磷量为51.64~199.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对溶磷能力最强的菌株SR95进行平板传代,并不断提高培养基中 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量,可使菌株的溶磷量从199.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 提高到243.71 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。对分离到溶磷能力较强的13株菌进行16S rDNA部分序列测定,经在线比对并构建系统发育树,发现其分布在7个不同种当中,其中溶磷能力最强的菌株SR95为成团泛菌,这在以往研究中未见报道。

关键词:大豆;根际;溶磷菌;溶磷能力

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0404

Isolation and Analysis on Ability of Phosphate Dissolving Bacteria in Rhizosphere of Soybean

WANG Hao, JIANG Yan, LIU Wei, LI Yuan-ming, YU Jia, WANG Shao-dong

(National Research Center of Soybean Engineering and Technology, Northeast Agricultural University, Harbin 150086, China)

Abstract: By using inorganic phosphate synthetic culture media, 223 strains of inorganic phosphate dissolving bacteria were isolated from soybean rhizosphere, 47 strains could produce dissolving phosphate zone among them, and adding 1% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ to soil was benefit to isolate strains with high ability of dissolving phosphate. The dissolving inorganic phosphate quantities measured were ranged from 51.64-199.20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Passage cultured the most powerful dissolving phosphate strain SR95 and improved the content of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in the media continuously, the dissolving inorganic phosphate quantities were improved from 199.20 to 243.71 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Sequenced partial 16S rDNA of the more powerful dissolving phosphate strains, nucleic acid sequence was blasted in GenBank online and phylogenetic tree was constructed. The result showed that all strains were in 7 different species, the most powerful dissolving phosphate strain SR 95 was identified as *Pantoea agglomerans*, which was not reported as dissolving phosphate bacteria previously.

Key words: Soybean; Rhizosphere; Phosphate dissolving bacteria; Phosphate dissolving ability

磷是植物生长所必需的三大营养元素之一,土壤中磷素的供给量也是农作物产量的重要限制因子。随着我国人口及经济的不断增长,对磷肥的消费量也在逐年递增,但是磷肥的利用率较低,具有易固定难移动的特点,大部分可溶性磷肥施入土壤后会被 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 以及 Al^{3+} 等固定,成为难以被植物吸收利用的无效磷,据统计目前我国土壤中累积的难溶性磷已高达6 000万t,超过目前全国磷肥年均消费量的10倍。此外,磷肥属不可再生资源,我国优质富磷矿资源不足,按照目前的消费趋势我国正面临着磷资源枯竭的局面。因此,挖掘土壤中潜在的磷库资源是缓解我国磷资源紧张、减少环境污染与能源浪费的有效途径,也是目前农业研究中的热点问题^[1]。

已有大量研究表明,在植物根际有大量的溶磷菌(phosphate dissolving microorganisms, PSM),能够将土壤中难溶性磷转化为可以被植物吸收利用的有效磷,与此同时溶磷菌还能够分泌促进植物生长的调节物质^[2],改善植物根际营养^[3],提高作物抗病能力^[4],从而提高农作物的产量^[5]。大豆是需磷较多的作物,较高的磷素水平能够提高大豆的产量和品质,因此开展大豆根际高效溶磷菌的分离和筛选工作对于提高我国大豆磷肥利用率,改善土壤环境,提高大豆品质具有重要意义,但是目前国内在这方面的研究工作还比较少见。本文针对黑龙江省大豆根际溶磷微生物资源进行分离和筛选,以期新型生物肥料的开发研制提供优良菌株和理论基础。

收稿日期:2013-11-21

基金项目:黑龙江省青年科学基金(QC2013C013);哈尔滨市科技局青年科技创新人才(2013RFQJ173);东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室开放基金(SB12B03);东北农业大学博士启动基金(2010RCB72)。

第一作者简介:王浩(1980-),女,博士,助理研究员,主要从事土壤微生物研究。E-mail:gallian2006@aliyun.com。

通讯作者:王绍东(1966-),男,博士,副研究员,主要从事大豆品质育种研究。E-mail:wsdhj@aliyun.com。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤为黑钙土取自国家大豆工程技术研究中心大棚, pH6.89, 有机质含量 $19.80 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮含量(N) $0.580 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效磷(P_2O_5)含量 $42.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾(K_2O)含量 $78.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 电导率(EC) $23.6 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$ 。供试大豆品种选用东北农业大学的育成品种东农46。

无机磷合成培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, NaCl 0.3 g, 葡萄糖 10 g, $\text{MnSO}_4(1\%)$ 1 mL, $\text{FeSO}_4(1\%)$ 1 mL, 琼脂 20 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。蒙金娜无机磷液体培养基: 葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 10 g, 酵母膏 0.4 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.0~7.5。牛肉膏蛋白胨培养基(NA): 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 试验设计 采用土壤盆栽试验, 在供试土壤中分别添加 0.5%、1.0%、1.5% 的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (分析纯), 拌匀后装入直径 30 cm, 高 35 cm 的塑料桶(桶底钻眼)中, 以土壤中不添加 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 处理为对照。每盆播种 3 粒, 出苗后间苗保留 1 株。每个处理 5 盆重复。定期浇水, 除草, 于初花期收获植株。

1.2.2 大豆根际溶磷菌分离 收获植株时, 小心抖落大豆根部的大块土壤, 保留粘附在根表面的土壤, 在子叶节处将植株剪断, 将植株根部置于一个装有玻璃珠和 100 mL 生理盐水的 250 mL 三角瓶中, 摇床上 $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 振荡 10 min, 成为根际土壤悬浮液。在该三角瓶中重复同一处理的 5 棵植株样品。室温静置 30 min 后取 0.5 mL 上清悬液, 加入到 4.5 mL 无菌生理盐水中振荡, 制成 10^{-1} 稀释度, 并依次类推至 10^{-7} 稀释度。取 $100 \mu\text{L}$ 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 三个稀释度涂布于无机磷合成培养基平板上。

28℃ 培养 5~7 d, 观察菌落特征, 并计数。挑取单菌落于 NA 斜面 4℃ 保存。

1.2.3 菌株溶磷能力测定 初筛: 挑取新鲜培养的菌体于无机磷合成培养基平板上划线, 28℃ 培养 7 d, 观察所产生的单菌落有无溶磷圈产生, 并测量溶磷比(溶磷圈直径/菌落直径)。

溶磷量测定: 对溶磷比 ≥ 1.5 的菌株, 接种 1 mL 菌液($10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)于 50 mL 蒙金娜无机磷液体培养基中, 28℃ 振荡培养 7 d, 超声波破碎细胞 20 min, $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取上清 3 mL, 以不接菌培养基作为对照, 采用钼锑抗比色法^[6], 测定菌株的溶磷量。

1.2.4 高效溶磷菌株的鉴定 对菌株进行革兰氏染色, 在显微镜下观察菌体形态及大小。同时, 参照刘晓颖等^[7]的方法提取菌体 DNA, 采用 16S rDNA 通用引物 799F(5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3')和 1492R(5'-TACGGHTACCTTGTTACGACTT-3')扩增菌体部分 16S rDNA 序列。序列提交到 Genbank 数据库中, 并与相近参比菌株进行在线比对, 用 Clustal X 软件包程序对序列进行排列后采用 Mega 4.0 软件构建系统发育树进行遗传鉴定。

2 结果与分析

2.1 大豆根际溶磷菌株分离

从添加不同比例 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 土壤中分离到的菌株数量有所不同(表 1), 在添加 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的大豆根际土中分离到的菌株总数最多(91 株), 随着 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 添加比例的增加分离到的菌株数量不断减少。在分离到的菌株中能在无机磷合成培养基上产生溶磷圈的解磷菌共有 47 株, 其中从添加 1% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 大豆根际土处理中分离到的溶磷菌数量最多, 为 22 株, 溶磷菌所占比例为 29.73%, 远高于添加 0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 1.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 处理。说明高 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量会抑制土壤中微生物数量, 1% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量有利于高效解磷菌的分离和筛选。

表 1 添加不同比例 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 土壤中大豆根际溶磷菌株数量分布

Table 1 Quantity distribution of phosphate dissolving bacterium in rhizosphere of *Glycine max* (L.)

菌株来源 Strains origin	菌株总数 Strains number	溶解无机磷菌株数 Strains number of dissolving inorganic phosphate	溶磷菌所占比例 The ratio of dissolving inorganic phosphate strains/%
0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	91	16	17.58
1.0% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	74	22	29.73
1.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	58	9	15.52

2.2 菌株溶磷能力初步筛选

溶磷圈直径(D)、菌落生长直径(d)及其比值是表征溶磷菌的相对溶磷能力的一个指标^[8],通过对47株大豆根际解磷菌溶磷圈进行测量发现,溶磷效果最好的菌株($D/d \geq 2.5$)有2株,占菌株总数的4.3%,其中溶磷菌SR95的溶磷比最高,达3.2;溶磷效果较好的($2.5 \geq D/d \geq 1.5$)有11株,占菌株总

数的23.4%;溶磷效果较差的($D/d \leq 1.5$)有34株,占溶磷菌总数的72.3%(表2),表明分离自添加1% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 大豆根际土壤中解磷能力较强的菌株较多,同时也说明在土壤中添加适宜比例的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 有利于从中筛选到较强溶磷能力的优良菌株。

表2 不同解磷能力菌株数量及来源分布

Table 2 Quantity and origin distribution of phosphate dissolving bacterium

菌株来源 Strains origin	$D/d \geq 2.5$	$2.5 \geq D/d \geq 1.5$	$D/d \leq 1.5$
0.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0	4	12
1.0% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	2	5	15
1.5% $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0	2	7

2.3 菌株溶磷量测定

首先在波长720 nm处,测定了含磷量分别为0,0.3,0.6,0.9,1.2,1.5,1.8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准溶液吸光度,绘制磷标准曲线(图1)。

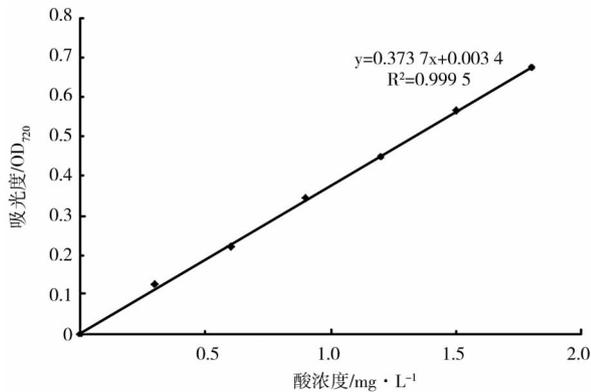


图1 磷标准曲线

Fig. 1 Standard curve of phosphate

通过钼锑抗比色法,测定13株溶磷比 ≥ 1.5 的高效解磷菌的吸光值,代入方程 $y = 0.3737x + 0.0034$ 中,计算菌株的溶磷量。结果表明,溶磷能力最强的菌株为SR95,其溶磷量为 $199.20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其余12株菌的溶磷量在 $51.64 \sim 105.85 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

对该菌株进行平板传代培养,并不断提高培养基中 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的含量,在无机磷合成培养基上连续传代3次, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的含量为3%时,溶磷圈更加明显见图2。

经测定,传代3次后的SR95溶磷量为 $243.71 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。该溶磷量与已有文献报道结果相比属于较高溶磷水平,具有很大的开发潜力和应用前景。

2.4 高效溶磷菌株的鉴定

对筛选到的高效溶磷菌(D/d 大于等于1.5)SR83,SR84,SR86,SR87,SR88,SR89,SR91,SR92,

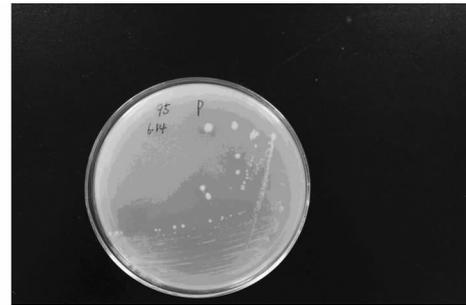


图2 SR95平板传代3次后的溶磷圈

Fig. 2 Dissolving phosphate zone of SR95 after passage cultured three times

SR93,SR94,SR95,SR96,SR97提取菌体DNA,扩增16S rDNA并测序,对测得序列在NCBI进行在线比对,下载相似性最高的已知菌序列,通过MEGA 4.1软件对所有序列构建系统发育树(图3)。

图3的结果表明所筛选到的高效溶磷菌主要分布在3个系统发育分支中,其中SR93,SR94,SR87,SR83,SR89,SR96这6株菌与西地西菌属的参比菌株 *Cedecea davisae* strain DSM 4568系统发育地位最近。SR86属于阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*),SR95位于成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)系统发育分支中。SR84位于肠杆菌科 *Enterobacter cowanii*系统发育分支中。SR97与不动杆菌 *Acinetobacter pittii* strain ATCC 19004系统发育地位相近。SR88,SR91和SR92都属于假单胞菌属,其中SR88与 *Pseudomonas rhodesiae* strain 1A系统发育地位最近,SR91和SR92与恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida* strain zhy34系统发育地位最近。

经鉴定,溶磷效率最高的菌株SR95属于成团泛菌,这在以往研究中还未见提及,由此可见,溶磷菌的资源仍有较大的挖掘潜力。

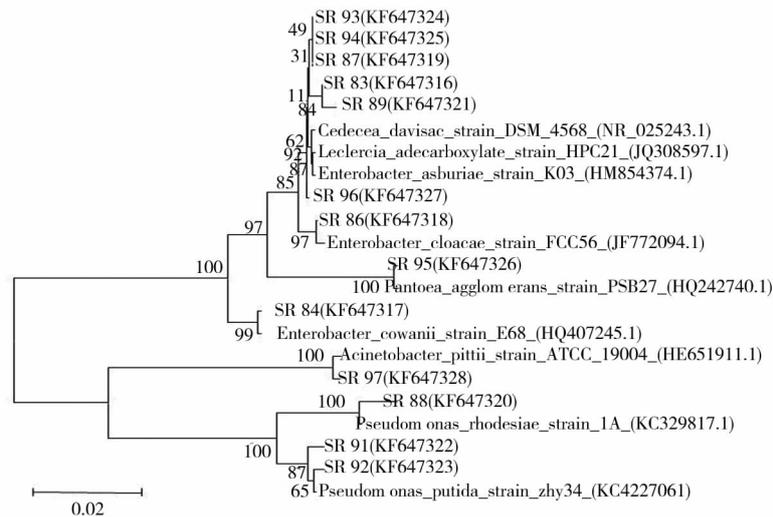


图3 溶磷菌 16S rDNA 系统发育树

Fig. 3 16S rDNA phylogenetic tree of phosphate dissolving bacterium

3 结论与讨论

研究表明,在土壤中添加适宜比例的磷酸盐有利于溶磷菌的富集和筛选,但随着添加量的不同,所分离到的溶磷菌数量及溶磷菌的溶磷能力有所不同,其中添加 1% 的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 有利于高效溶磷菌的分离。

高效溶磷菌 ($D/d \geq 2.5$) 在所分离到的菌株中所占比例较小,因此增加处理的重复及样本量有利于高效溶磷菌的筛选,对筛选到的高效菌株继续在磷酸盐培养基上进行传代培养可以增强菌株解磷能力的稳定性并促进菌株解磷能力向更高水平提高。

以往研究中从作物根际土壤中分离到的溶磷菌大多数属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*)^[9]、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)^[8] 和草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*)^[10] 等。本研究中所分离到的高效溶磷菌主要分布在 7 个种当中,其中成团泛菌是在以往研究中没有报道的,表明大豆根际溶磷菌的数量和种类较为丰富。本研究中筛选到一株高效溶解无机磷的菌株 SR95,但是该菌株在田间的生存竞争力及溶磷能力还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料,2001,5(3):7-11. (Zhao X R, Lin Q M. A review of phosphate-dissolving microorganisms[J]. Chinese Journal of Soil Science,2001,5(3):7-11.)
- [2] 李蓉,周德明,吴毅,等. 杉木根际溶磷菌筛选及其部分特性的初步研究[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(4):95-99. (Li R, Zhou D M, Wu Y, et al. Selection and characteristics of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Cunninghamia lanceolata*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2012,32(4):95-99.)
- [3] Yi Y M, Huang W Y, Zhang C X. Amelioration of salt stress on wheat plants growth in coastal saline soil by a phosphate solubiliz-

ing bacterium *Enterobacteria* sp. EnHy-401 [J]. Agriculture Science & Technology,2010,11(6):141-146.

- [4] 韩梅,温志丹,肖亦农,等. 解磷细菌的筛选及对植物病原真菌的拮抗作用[J]. 沈阳农业大学学报,2009,40(5):594-597. (Han M, Wen Z D, Xiao Y N, et al. The screening of an organo-phosphate-degradation bacteria and its antagonism [J]. Journal of Shenyang Agricultural University,2009,40(5):594-597.)
- [5] 李玉娥,姚拓,荣良燕. 溶磷菌溶磷和分泌 IAA 特性及对苜蓿生长的影响[J]. 草地学报,2010,18(1):84-88. (Li Y E, Yao T, Rong L Y. Characteristics of IAA secretion and phosphate dissolving of phosphate-solubilizing bacteria and its effect on alfalfa growth [J]. Acta Agrestia Sinica,2010,18(1):84-88.)
- [6] 张祥胜. 钼锑抗比色法测定磷细菌发酵液中有效磷含量测定值的影响因素分析[J]. 安徽农业科学,2008,36(12):4822-4823. (Zhang X S. Analysis of the factors affecting the available P content in the fermentation liquid of P bacteria determined by Mo-Cb colorimetry [J]. Journal of Anhui Agricultural Science,2008,36(12):4822-4823.)
- [7] 刘晓颖,马敏,王迅,等. 优化血小板制品中细菌基因组抽提方法[J]. 现代临床医学,2007,33(4):252-254. (Liu X Y, Ma M, Wang X, et al. Optimization of methods for extracting bacterial genomic DNA in platelet products [J]. Journal of Modern Clinical Medicine,2007,33(4):252-254.)
- [8] 覃丽金,杨礼富,袁坤,等. 10 种热带牧草根际高效解磷细菌的筛选及其培养条件[J]. 热带作物学报,2009,30(11):1630-1636. (Tan L J, Yang L F, Yuan K, et al. Screen and culture condition of phosphate dissolving bacteria at the rhizosphere of 10 tropical pasture [J]. Chinese Journal of Tropical Crops,2009,30(11):1630-1636.)
- [9] 臧威,孙剑秋,王鹏,等. 东北地区四种农作物根际磷细菌的分布[J]. 中国生态农业学报,2009,17(6):1206-1210. (Zang W, Sun J Q, Wang P, et al. Distribution of phosphobacteria in rhizosphere soils of four crops in northeast China [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture,2009,17(6):1206-1210.)
- [10] 杨慧,范丙全,龚明波,等. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究[J]. 微生物学报,2008,48(1):51-56. (Yang H, Fan B Q, Gong M B, et al. Isolation and identification of a novel phosphate-dissolving strain P21 [J]. Acta Microbiologica Sinica,2008,48(1):51-56.)