

兼容 5 种难溶磷的溶磷细菌筛选及其对花生的促生作用

张淑红

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

摘要: 从生活垃圾堆积地采集土样,通过平板初筛和液体摇瓶复筛得到 1 株高效兼容 5 种难溶磷的溶磷细菌菌株 SY0,培养 6 d 后该菌株对卵磷脂、磷酸钙、磷酸铁、磷酸铝及磷矿粉的溶磷量分别可达 23.1、598.1、14.3、18.6、43.2 mg/L,经过生理生化及 16S rDNA 序列鉴定,初步确定 SY0 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。利用滤纸法和盆栽试验研究该菌株对花生生长发育的影响发现,该菌株菌液 100 倍稀释液处理的种子发芽势比对照(无菌水处理)提高 30.23%。施入 SY0 菌液后花生出苗时间提前 2 d;苗期地上部分鲜质量、干质量、叶绿素含量、根系鲜质量、根系干质量、根系活力分别比对照(自来水处理)显著增加 33.24%、19.80%、28.59%、51.25%、38.89%、51.83%;开花时间提前 2 d,开花相对集中;生物产量、百仁质量和荚果产量分别比对照显著提高 7.97%、8.29% 和 9.88%。

关键词: 溶磷菌;巨大芽孢杆菌;花生;促生

中图分类号: S154.3;S565.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)11-0058-05

Screening of Phosphate-dissolving Bacterium Capable of Dissolving Five Kinds of Insoluble Phosphates and Its Promotion Effect on Growth of Peanuts

ZHANG Shuhong

(Faculty of Life Science, Tangshan Teachers College, Tangshan 063000, China)

Abstract: A bacterium strain capable of dissolving five kinds of insoluble phosphates was isolated from the living garbage dumping soil by plate screening and liquid submerged culture, named as SY0. By use of the bacterium strain SY0, the water-soluble phosphorus concentration could be increased to 23.1, 598.1, 14.3, 18.6 and 43.2 mg/L after six days treated by lecithin, tricalcium phosphate, ferric phosphate, aluminium phosphate and ground phosphate rock respectively. The strain SY0 was identified as *Bacillus megaterium* by physiological identification and 16S rDNA gene sequencing analysis. The effects of the strain on peanuts growth were studied by the filter paper method and pot experiment. The results showed that after treated with 100-fold dilution of the original bacterial culture, the germination potentiality of peanut increased by 30.23%. After treated by SY0, the peanut seeds sprouted two days earlier, the chlorophyll content increased by 28.59%, the root activity increased by 51.83%, and the weight of fresh above-ground plant, dry above-ground plant, fresh root system and dry root system increased by 33.24%, 19.80%, 51.25% and 38.89% respectively. Moreover, after treated by the bacterium strain SY0, the flowers appeared two days earlier, the flowering stage was centered, and the biological yield, hundred kernel weight and pod yield increased by 7.97%, 8.29% and 9.88% respectively.

收稿日期:2015-05-10
基金项目:唐山市科技计划项目(12120210A);唐山师范学院科学研究基金项目(2015C07)
作者简介:张淑红(1978-),女,河北石家庄人,副教授,硕士,主要从事植物与微生物相互关系研究。
E-mail:zsh3535@163.com

Key words: phosphate-dissolving bacterium; *Bacillus megaterium*; peanuts; growth promotion

土壤中约 95% 的磷都是难溶性磷,植物难以利用,称为无效磷。无机无效磷主要包括镁、锌、钙、铝等的磷酸盐,有机无效磷主要以核酸和磷脂等形态存在。土壤中存在大量的溶磷微生物(溶磷菌),它们能溶解土壤中的无效磷,促进作物对磷素的吸收和利用。研究表明,溶磷菌在溶解无效磷、提高磷肥利用率、促进作物生长方面都具有显著的作用^[1-4]。溶磷菌种类繁多,包括细菌、真菌和放线菌,目前筛选出的溶磷菌达到 90 种以上,其中溶磷细菌研究最多,分离出来的种类也最多;溶磷真菌在数量上远不如溶磷细菌多,主要局限于青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)、镰刀菌(*Fusarium*)、小菌核菌(*Sclerotium*)等;而溶磷放线菌的研究最少,大部分为链霉菌(*Streptomyces*)^[5]。

不同溶磷菌对各种无效磷的溶解能力不同。目前,文献报道的溶解无机磷的细菌菌株主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)等^[6-8];而溶解有机磷的细菌菌株主要是芽孢杆菌属^[9]。关于溶磷细菌的报道主要集中于菌株对某一种磷源的溶解,对于同时兼溶多种难溶磷的溶磷细菌筛选鲜有报道^[6,10]。

花生是一种重要的油料作物,增施磷肥可以有效促进其生长,提高产量,但是花生对当季所施磷素化肥的吸收利用率比较低,为 5% ~ 25%^[11]。溶磷菌在大豆、油菜等油料作物中的溶磷促生作用已有较多报道^[12-14],但在花生种植中少有研究。为此,本研究筛选兼溶 5 种常见难溶磷的溶磷细菌,分析其对花生生长发育的影响,为溶磷细菌的利用以及改善花生磷素供给、提高产量等提供研究基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试菌株筛选土壤取自生活垃圾堆积地非根际土壤。盆栽试验土壤取自唐山市农业科学研究院试验田 0 ~ 20 cm 土壤,采回的土壤经风干后粉碎、过筛,土壤含全磷 0.49 g/kg、速效磷 5.15 mg/kg。供试花生(*Arachis hypogaea* L.)品种为唐 8252。供试难溶磷培养基含葡萄糖 10.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L、NaCl 0.3 g/L、KCl 0.3 g/L、MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g/L、FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g/L、MnSO₄ 1.0 g/L、单

一难溶磷酸盐(磷酸钙、磷酸铁、磷酸铝、磷矿粉) 5.0 g/L或卵磷脂 2.0 g/L,pH 值 7.0 ~ 7.5。

1.2 试验方法

1.2.1 溶磷细菌的筛选 将采集的土样稀释后涂布于卵磷脂固体培养基平板中,30 ℃ 培养 6 d,将菌落周围产生明显解磷圈的单菌落纯化后用牙签分别点接在其他 4 种难溶磷固体培养基上,30 ℃ 培养 6 d,挑选在 4 种难溶磷固体平板上均能产生明显解磷圈的菌株,按 1% 接种量分别接入 5 种难溶磷液体培养基中,摇床培养 6 d(30 ℃、150 r/min)。菌液经 10 000 r/min 离心 10 min,用钼锑抗比色法测定上清液中可溶性磷含量,选择溶磷量最大的菌株进行后续试验。

1.2.2 菌株鉴定 参照文献[15]中的方法对上述筛选的溶磷菌株进行生理生化鉴定。同时进行序列分析和系统发育树分析。利用试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取溶磷菌基因组 DNA,进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。引物 P1:5' - AGAGTTT-GATCMTGGCTCAG - 3'; P2:5' - TACGGYTACCTT-GTTACGACTT - 3'。反应条件:95 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min、55 ℃ 1 min、72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 10 min。扩增产物纯化回收后连接 T 载体进行测序,将测序结果进行比对,采用 Mega 5.05 软件邻接法(Neighbor-Joining method)构建系统发育树。

1.2.3 滤纸法测定花生种子的发芽率和发芽势

将菌液按 2% 接种量接种于 LB 液体培养基中,30 ℃、120 r/min 培养 2 d,然后 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液备用。试验共设 7 个处理,即 LB 液体培养基和菌液的 20 倍稀释液、50 倍稀释液、100 倍稀释液及无菌水(对照)。将选好的花生种子分别在上述溶液中浸种 8 h。将各处理的种子沥出移入装有被灭菌水浸润滤纸的培养皿中,每皿放入 40 粒,每处理设 3 个重复。于恒温培养箱中 25 ℃ 培养 10 d,每天调查种子的萌发情况,计算各个培养皿中花生种子的发芽率和发芽势^[16]。

1.2.4 盆栽试验 每盆装土 6 kg,接种量为每盆 50 mL 菌悬液(4 × 10⁵ cfu/mL),每个花盆中均匀接入 4 粒花生种子,出苗后选留 2 株。试验期间,实时给植株除草、浇水。每盆浇水量保持一致,每次约 250 mL。每天调查花生的出苗情况,记录出苗时间、出苗率;花生出苗 15 d 后记录植株株高、植株地上部分干质量和鲜质量、根系长度、根系干质量、根系鲜质量,并利用分光光度法测定叶绿素含量^[17],

TTC 法测定花生根系活力^[18];自始花起,隔日记录当日开花量,记录 1 个月。收获时调查百仁质量和荚果产量。以自来水处理为对照,各处理 6 个重复。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌株的分离、筛选及溶磷能力分析

初筛得到 101 株可以溶解卵磷脂的菌株。将这些菌株点接于其他 4 种难溶磷固体平板上,其中 4 株菌株(SY0、SY4、SY12、SY19)在所有平板上均出现明显解磷圈,说明这 4 株菌株具有降解 5 种难溶磷的能力。液体摇瓶复筛试验(表 1)表明,SY0 菌株对 5 种难溶磷的溶解作用较强,用于进行后续试验。

表 1 菌株对 5 种难溶磷的溶磷量 mg/L					
菌株	卵磷脂	磷酸钙	磷酸铁	磷酸铝	磷矿粉
SY0	23.1a	598.1b	14.3a	18.6a	43.2a
SY4	12.5b	345.0d	11.6b	19.9a	20.3b
SY12	29.7a	444.7c	4.6c	16.5a	16.8c
SY19	10.2b	653.6a	13.8a	19.0a	7.7d

注:表中同列数据后不同小写字母表示差异达显著($P < 0.05$)水平,下同。

2.2 SY0 菌株的初步鉴定

对 SY0 菌株继续进行生理生化试验发现,菌株 SY0 的生长温度为 5~40℃,厌氧环境下不能生长,接触酶和苯丙氨酸脱氨酶试验为阳性,V-P 反应为阴性,能利用柠檬酸盐,能水解明胶和淀粉,能利用 D-葡萄糖、D-甘露醇、L-阿拉伯糖产酸,在糖类

中生长不产气。SY0 菌株的 16S rDNA 序列长度为 1 402 bp。结合上述生理生化试验及 16S rDNA 序列分析(图 1)初步确定 SY0 为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

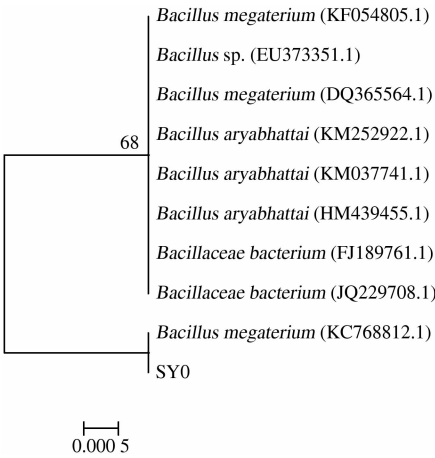


图 1 菌株 SY0 与相关已知菌株基于 16S rDNA 序列的系统发育树

2.3 SY0 菌株对花生生长发育及产量的影响

2.3.1 种子发芽率和发芽势 由表 2 可知,与 LB 液体培养基处理相比,SY0 菌液的稀释液处理能提高种子的发芽率和发芽势,且菌液浓度越低提高幅度越大。与对照相比,低浓度的 SY0 菌液(SY0 菌液的 100 倍稀释液)对花生种子的发芽率和发芽势具有不同程度的促进作用。其中,SY0 菌液的 100 倍稀释液处理的种子在发芽率上略高于对照,而发芽势增加明显,比对照提高了 30.23%。

处理	发芽率/%			发芽势/%		
	20 倍稀释液	50 倍稀释液	100 倍稀释液	20 倍稀释液	50 倍稀释液	100 倍稀释液
对照		86.77			38.41	
LB 液体培养基	50.02	68.82	80.33	14.93	22.58	37.91
菌液	69.91	82.45	90.86	21.32	38.98	50.02

2.3.2 出苗情况 由表 3 可知,经 SY0 菌液处理后,花生出苗时间比对照提前 2 d,但是出苗率没有变化。

表 3 花生出苗情况				
处理	播期/月-日	出苗期/月-日	出苗时间/d	出苗率/%
对照	05-18	05-24	7	98
菌液	05-18	05-22	5	98

液后,苗期花生株高和根系长度比对照略低,但差异不显著,其他各项指标均显著提高。其中,地上部分鲜质量、干质量和叶绿素含量分别增加了 33.24%、19.80% 和 28.59%,根系鲜质量、干质量及根系活力分别比对照提高了 51.25%、38.89% 和 51.83%。因此,施入 SY0 菌株可以有效促进花生苗期地上部分和根系的生长。

2.3.3 苗期生长情况 由表 4 可知,施用 SY0 菌

处理	株高 /cm	叶绿素含量 /(mg/g)	地上部分		根系		长度/cm	活力/[(mg/(g·h))]
			鲜质量/g	干质量/g	鲜质量/g	干质量/g		
对照	20.62a	15.25b	6.89b	1.01b	0.80b	0.18b	10.8a	19.1b
菌液	20.51a	19.61a	9.18a	1.21a	1.21a	0.25a	9.2a	29.0a

表 4 菌株 SY0 对花生苗期生长的影响

2.3.4 开花情况 由图 2 可以看出,施用 SY0 菌液后,花生开花时间提前 2 d,且开花相对集中,高峰期花量多,达到高峰后开花量很快下降,缩短了花期。

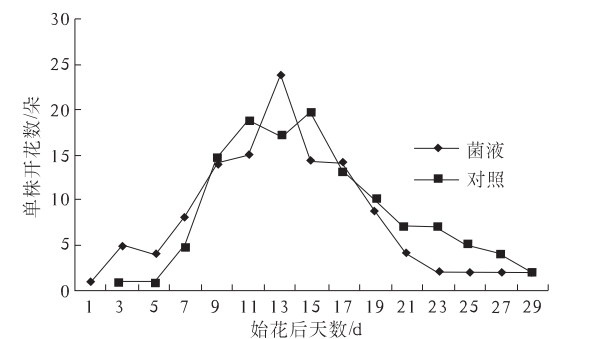


图 2 花生开花动态

2.3.5 产量 由表 5 可知,施用 SY0 菌液后,花生的生物产量、百仁质量和荚果产量分别显著提高 7.97%、8.29% 和 9.88%。表明,在土壤中施用 SY0 菌株可以显著提高花生产量。

表 5 菌株 SY0 对花生产量的影响

处理	生物产量/(g/盆)	百仁质量/g	荚果产量/(g/盆)
对照	16.81b	55.39b	8.40b
菌液	18.15a	59.98a	9.23a

3 结论与讨论

本研究通过初筛和复筛得到 1 株高效兼容 5 种难溶磷的溶磷菌株 SY0,经鉴定该菌株为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。与国内外研究^[8-9,19-21]比较后发现,该菌株无论对无机磷还是有机磷均具有较高水平的溶解能力。溶磷菌针对不同难溶磷的溶磷机制存在差异,目前认为有机酸和磷酸酶是 2 种主要的溶磷物质^[22-25],SY0 菌株体内可能具有溶解 5 种难溶磷的机制,但其具体的溶磷物质有待进一步研究。

本研究结果表明,低浓度的 SY0 菌液对花生种子的发芽率没有明显提高作用,但是能明显促进花生种子的发芽势。朱培森等^[8]发现,溶磷菌菌液对玉米种子的发芽率具有显著的促进作用,这与本研究结果不同,可能是各种溶磷菌在培养过程中,胞外分泌物的种类和含量存在一定差异。盆栽试验证明,低浓度的 SY0 菌株可以加快花生出苗的速度,但是刺激种子发芽的成分还需进一步分析。

前人研究^[8,24,26-27]发现,接种溶磷菌处理的玉米、番茄、小麦、大豆苗期的株高、生物量、根干质量等指标显著高于对照。本研究的盆栽试验结果表明,SY0 菌株可以明显促进花生苗期地上部分和根

系的生长发育,与前人的研究结果基本一致。徐亮等^[11]研究表明,增施磷肥可以促进茎、叶等营养器官中物质向荚果中的转化,本试验中花生开花期提前 2 d,且开花相对集中,花生的荚果产量、生物产量和百仁质量均显著提高,表明增施溶磷菌可以提高土壤中可溶性磷含量,从而对花生起到促生作用。

溶磷菌对作物的促生作用机制是多方面的,一是由于溶磷菌的高效溶磷效果补充了根系的磷素供给,同时促进 N、K、Ca、Mg、Fe、Zn 等营养元素的吸收和利用,刺激植物快速生长;二是溶磷菌在土壤中分泌多种物质,比如蛋白质、氨基酸、多糖、植物激素等,改变根际营养成分;三是溶磷菌在作物根部土壤中大量繁殖,使其他病原微生物减少了繁殖机会,同时对某些病原微生物还具有拮抗作用,所以能更好地促进植物防御病虫害能力;四是溶磷菌作用于植物,改善植物根际环境,从而提高植物的抗逆性。本研究在盆栽试验过程中选取了几个生长发育指标,所以只能初步分析溶磷菌对花生生长的影响,下一步需要进行田间试验,才能精确地研究溶磷菌对花生的溶磷促生作用。

参考文献:

[1] 林启美,赵小蓉,孙焱鑫,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.

[2] 余旋,朱天辉,刘旭,等. 不同解磷菌剂对美国山核桃苗生长、光合特性及磷素营养的影响[J]. 果树学报,2010,27(5):725-729.

[3] 蒋欣梅,夏秀华,于锡宏,等. 微生物解磷菌肥对大棚茄子生长及土壤有效磷利用的影响[J]. 浙江大学学报:理学版,2012,39(6):685-688.

[4] 金术超,杜春梅,平文祥,等. 解磷微生物的研究进展[J]. 微生物学杂志,2006,26(2):73-78.

[5] 朱斌. 玉米根际高效溶磷菌株的分离鉴定、室内溶磷条件和溶磷效果研究[D]. 重庆:西南大学,2012.

[6] 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.

[7] 王浩,姜妍,刘伟,等. 大豆根际高效溶磷菌株的分离及溶磷能力分析[J]. 大豆科学,2014,33(3):404-407.

[8] 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.

[9] Tao G C,Tian S J,Cai M Y,et al. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils[J]. Pedosphere,2008,18(4):515-523.

[11] 张学君,凌宏通,李洪连,等. 生物农药麦丰宁 B3 对小麦纹枯病菌的抑制作用[J]. 植物病理学报,1994,24 (4):194-199.

[12] 李明,双宝,李海涛,等. 枯草芽孢杆菌的研究与应用[J]. 东北农业大学学报,2009,40(9):111-114.

[13] 齐永志,赵斌,李海燕,等. 多功能菌 B1514 在小麦根际的定殖及对纹枯病的防治作用[J]. 植物保护学报,2014,41(3):320-326.

[14] 李海燕,苏媛,齐永志,等. 多功能土壤添加剂对小麦土传病害的防效及对玉米秸秆的腐解作用[J]. 河南农业科学,2015,44(6):84-89.

[15] 李社增,马平,鹿秀云,等. 微生物农药“菱菌净”可湿性粉剂研制与应用[C]//第四届全国绿色环保农药新技术、新产品交流会暨第三届生物农药研讨会论文集. 哈尔滨:中国农药工业协会,2006.

[16] 赵斌,齐永志,李海燕,等. 枯草芽孢杆菌 B1514 菌株发酵条件的优化与片剂制作研究[J]. 河北农业大学学报,2014,37(3):60-65.

[17] 中国石油和化学工业协会. GB/T 14825—2006 农药悬浮率测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2006.

[18] 中华人民共和国国家石油和化学工业局. GB/T 5451—2001 农药可湿性粉剂润湿性测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2001.

[19] 中华人民共和国化学工业部. GB/T 16150—1995 农药粉剂、可湿性粉剂细度测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,1995.

[20] 中华人民共和国国家石油和化学工业局. GB/T 1600—2001 农药水分测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2001.

[21] 中华人民共和国化学工业部. GB/T 1601—1993 农药 pH 值测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,1993.

[22] 中华人民共和国国家石油和化学工业局. GB/T 19136—2003 农药热贮稳定性测定方法[S]. 北京:中国标准出版社,2003.

[23] 汪敏,吕柏林,邢小萍,等. 河南省小麦纹枯病菌的群体组成及其致病力分化研究[J]. 植物病理学报,2011,41(5):556-560.

[24] 李山东,于金凤,彭迪,等. 枯草芽孢杆菌 NJ-18 和氟酰胺联合拌种防治小麦纹枯病研究[J]. 农药学报,2013,15(4):427-433.

[25] 王剑,王楠,高观朋,等. 200 亿芽孢/g 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂的研制[J]. 农药,2010,49(7):486-489.

(上接第 61 页)

[10] 朱斌,黄爱纓,蔡一林,等. 兼溶多种难溶磷的溶磷菌筛选及其对玉米幼苗生长的影响[J]. 西南大学学报:自然科学版,2013,35(9):11-16.

[11] 徐亮,王月福,程曦,等. 施磷对花生根系生长发育和产量的影响[J]. 花生学报,2009,38(1):32-35.

[12] 王芳,谢庭生. 酸性紫色土施用溶磷菌对大豆的增产效应[J]. 湖南农业科学,2012(17):61-63.

[13] 李娟,王文丽,卢秉林. 解磷微生物菌剂对油菜生长及产量的影响[J]. 中国土壤与肥料,2010(3):67-69.

[14] Hameeda B, Srijana M, Rupela O P, et al. Effect of bacteria isolated from composts and macrofauna on sorghum growth and mycorrhizal colonization[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2007, 23 (6): 883-887.

[15] 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.

[16] 李双铃,袁美,任艳,等. 花生种子发芽率快速测定法[J]. 花生学报,2004,33(4):30-32.

[17] 李玲. 植物生理学模块实验指导[M]. 北京:科学出版社,2009.

[18] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社,2000.

[19] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 34(1):33-41.

[20] Chung H, Park M, Madhaiyan M, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(10):1970-1974.

[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):64-71.

[22] 刘文干,何园球,张坤,等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. 微生物学报,2012,52(3):326-333.

[23] 李显刚,王小利,姚拓,等. 溶磷菌的溶磷、分泌 IAA 及有机酸特性研究[J]. 土壤通报,2012,43(6):1385-1390.

[24] Rashid M, Khalil S, Ayub N. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms (PSM) under *in vitro* conditions[J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2004, 2: 187-196.

[25] 虞伟斌,杨兴明,沈其荣,等. K3 解磷菌的解磷机理及其对缓冲容量的响应[J]. 植物营养与肥料学报,2010,16(2):354-361.

[26] Babana A H, Antoun H. Biological system for improving the availability of Tilemsi phosphate rock for wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivated in Mali[J]. Nutrient Cycling in Agroecosystems, 2006, 76(2/3):285-295.

[27] Hariprasad P, Niranjana S R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato[J]. Plant and Soil, 2009, 316(1/2):13-24.