

DOI: 10.11829/j.issn.1001-0629.2014-0163

马文文,姚拓,蒲小鹏,卢虎,张玉霞,王国基.东祁连山 7 种禾草根际溶磷菌筛选及其溶磷特性[J].草业科学,2015,32(4): 515-523.

MA Wen-wen, YAO Tuo, PU Xiao-peng, LU Hu, ZHANG Yu-xia, WANG Guo-ji. Screening and characteristics of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of 7 grasses on eastern Qilian Mountains[J]. Pratacultural Science, 2015, 32(4): 515-523.

东祁连山 7 种禾草根际溶磷菌筛选 及其溶磷特性

马文文,姚拓,蒲小鹏,卢虎,张玉霞,王国基

(甘肃农业大学草业学院 草业生态系统教育部重点实验室,甘肃 兰州 730070)

摘要:采用 PKO 无机磷和蒙金娜有机磷选择性培养基,从东祁连山(甘肃省天祝县及周边地区)天然草地上的 7 种禾草根际分离出溶解无机磷菌株 109 株,溶解有机磷菌株 143 株。各菌株生长速度及形态特征差异较大。7 种禾草根际溶解无机和有机磷菌株数量,除醉马草(*Achnatherum inebrians*)溶解无机磷呈根表土壤>根系表面>根内的分布趋势外,其他均呈现出根系表面>根表土壤>根内的分布趋势。大部分溶解无机磷菌株在 10 d 时溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)不再增大,而溶解有机磷菌株则在 14 d 时不再增大。利用钼蓝比色法测定菌株溶磷能力,结果表明,109 株溶解无机磷菌株培养液中有效磷含量在 $0.47\sim 582.46\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大为菌株 PCR5;143 株溶解有机磷菌株培养液中有效磷含量在 $0.07\sim 14.76\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,最大为菌株 MCMRS4;蒙金娜培养基 pH 与有机磷菌株有效磷含量无显著相关性($P>0.05$),PKO 培养基 pH 与无机磷菌株有效磷含量之间呈极显著负相关($P<0.01$)。

关键词:禾草;无机溶磷菌;有机溶磷菌;溶磷性能

中图分类号:S544.01;Q945.12

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2015)04-0515-09*

Screening and characteristics of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of 7 grasses on eastern Qilian Mountains

MA Wen-wen, YAO Tuo, PU Xiao-peng, LU Hu, ZHANG Yu-xia, WANG Guo-ji

(Pratacultural College, Gansu Agricultural University; Key Laboratory of Grassland Ecosystem,
Ministry of Education, Lanzhou 730070, China)

Abstract: Phosphate dissolving bacteria had been isolated from rhizosphere of 7 kinds of grasses based on PKO and Mehknha culture media. The results showed that there were different colony characteristics in growth rate, color, shape, edge integrity, as well as the surface condition of the ridge in different bacteria strains. The number of inorganic phosphate solubilizing strains from rhizosphere of *Achnatherum inebrians* showed that soil adhering to roots>rhizoplan or surface of roots>histoplan or interior of roots, strains from others grasses were rhizoplan or surface of roots>soil adhering to roots>histoplan or interior of roots distribution trend. In the first 10 days, most of the dissolved inorganic phosphorus strain's D/d stabilized, but most of the dissolved organic phosphorus strain stabilized in the first 14 d. Phosphorus solubilizing capability of the strains were determined by the molybdenum blue spectrophotometry, the results

* 收稿日期:2014-04-09 接受日期:2014-10-27

基金项目:国家自然科学基金(31360584);国家科技支撑计划(2012BAC01B02-4)

第一作者:马文文(1988-),女,甘肃甘谷人,在读硕士生,主要从事草地微生物生态研究。E-mail:834582161@qq.com

通信作者:姚拓(1968-),男,甘肃镇原人,教授,博士,主要从事草地微生物生态和草地微生物资源利用研究。E-mail:yaotuo@gsau.edu.cn

indicated that there were larger differences in 109 phosphate-dissolving microorganisms capability, phosphate concentration was between $0.47 \sim 582.46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, of which strain PCR5 had the highest phosphate solubilization capacity. For the 143 strains organic phosphate dissolving bacteria, the ability to dissolve organic phosphorus was large (concentration was $0.07 \sim 14.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), the highest P concentrations was strains MCMRS4. There were no obvious relationship between the organic phosphorus strains solubilization capacity and pH ($P > 0.05$), however pH of PKO showed significant negative relationship with the organic phosphorus strains P concentration ($P < 0.01$).

Key words: grasses; inorganic phosphate solubilizing bacteria; organic phosphate solubilizing bacteria; capacity of dissolving phosphate

Corresponding author: YAO Tuo E-mail: yaotuo@gsau.edu.cn

磷是植物生长所需的大量、重要营养元素。目前,我国农牧业生产中,磷肥的主要来源是化肥,化肥在作物、蔬菜、牧草的产量提高方面起到了巨大作用,同时出现了不少弊端^[1]。如随着化肥使用量的增加,土壤结构遭到破坏,环境受到污染,微生物多样性下降等。我国耕地土壤 74% 缺磷,但土壤中 95% 的磷为无效形式,很难被植物直接吸收与利用,且施入磷肥中的大部分磷和土壤中的 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 及 Al^{3+} 结合形成难溶性磷酸盐^[2-4]。因此,开发利用新兴肥料替代化肥已是当务之急,微生物肥料的研究与开发在提高土壤的养分利用率、改善土壤状况及调节土壤肥力方面起着巨大作用^[5]。而溶磷微生物通过释放有机酸等,溶解难溶性磷酸盐或者分泌磷酸酶以降解有机磷,从而提高土壤中可溶性磷的浓度,使之有效地被植物吸收与利用^[6]。

溶磷菌自被发现以来,很多学者进行了大量研究。前苏联学者 Mehkha 于 1935 年首次从黑钙土壤中分离出一株形态与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 相似的解磷细菌,能够分解核酸和卵磷脂,施入土壤后使 P_2O_5 提高了 15% 以上^[7]。近些年,国内外有关溶磷菌研究的报道很多^[8-13],多集中在菌株对植物的促生作用,如郜春花等^[14]利用溶磷菌株 B2 和 B67 研制的菌剂,通过盆栽试验发现,施用了溶磷菌剂后,玉米 (*Zea mays*) 株高、干质量和鲜质量较对照有较大幅度的增加;张英等^[15]采用溶磷复合接种剂处理红三叶 (*Trifolium pratense*) 种子发现,处理后红三叶的株高和根长较对照增加了 33.62% 和 46.20%。因此,从不同植物根际筛选高效的溶磷菌对植物的生长有重要作用。

目前,植物根际溶磷菌研究涉及到很多植物,如

燕麦 (*Avena sativa*)^[16]、小麦 (*Triticum aestivum*), 玉米、甘蔗 (*Saccharum officinarum*)^[17], 水稻 (*Oryza sativa*)^[18], 国外有雀稗 (*Paspalum* spp.)^[19]、玉蜀黍^[20]等,但对东祁连山天然草地禾草,如高原早熟禾 (*Poa alpigena*)、垂穗披碱草 (*Elymus nutans*)、醉马草 (*Achnatherum inebrians*)、赖草 (*Leymus secalinus*)、冰草 (*Agropyron cristatum*)、紫花针茅 (*Stipa purpurea*)、糙毛鹅观草 (*Roegneria hirsuta*) 等根际溶磷菌资源的研究尚未见报道。这 7 种禾草是东祁连山天然草地中常见的植物,其中高原早熟禾适应性强、耐寒、耐旱、绿期长,经培育后,可作为适宜高寒气候条件的草坪草种。垂穗披碱草具有很强的可塑性,耐瘠薄,适应北方各种类型的土壤,耐牧性强,产草量高。赖草耐旱、耐寒,耐轻度盐渍化土壤,而且适应范围广,从暖温带、中温带的森林草原到干草原、荒漠草原、草原化荒漠。冰草、紫花针茅及糙毛鹅观草都有丰富的营养价值,家畜都喜食。醉马草虽是有毒植物,但其营养价值高,若使用新疫苗免疫动物,可使动物安全地利用醉马草,从而减少人工挖除醉马草与化学除草等造成的环境污染、草地退化和水土流失等现象。本研究从东祁连山天然草地主要禾草根际分离筛选高效溶磷菌并研究其溶磷特性,以期为高寒地区研制高效复合接种剂提供菌种,同时丰富促生菌资源库。

1 材料与方 法

1.1 研究区自然概况

东祁连山天然草地,以甘肃省天祝县高寒草地为主,辐射周边地区,位于 $37^{\circ}11' - 37^{\circ}13' \text{ N}$, $102^{\circ}29' -$

102°33' E。平均海拔 2 700~3 300 m,气候潮湿阴冷,空气稀薄且紫外线辐射强烈。该区年降水量 416 mm,且多为地形雨,集中于 7、8 和 9 月,年蒸发量 1 592 mm;年平均温度-0.1 °C,1 月均温-18.3 °C,7 月均温 12.7 °C,>0 °C 年积温为 1 380 °C·d;水热同期,年日照时数为 2 600 h;没有绝对无霜期,只有冷、热两季,春季常出现旱象,且有暴风雪。

1.2 研究材料与方法

2012 年 9 月在放牧强度小的围栏内天然草地上采样。在 7 种禾草(高原早熟禾、垂穗披碱草、醉马草、赖草、冰草、紫花针茅和糙毛鹅观草)样地类型内采用“S”型取样法,设 1 m×1 m 样方 5 个,在每个样方内用 75%乙醇消毒后的土铲,挖取各植物根际(根系和土壤)样品。7 种禾草的 5 份样品分别装入无菌聚乙烯袋中,放入标签,封口,置于冰筒中带回实验室立即进行溶磷菌分离、筛选^[21]。

1.2.1 溶磷菌的筛选

1)培养基。分离溶解无机磷菌用 PKO 培养基^[22];分离溶解有机磷菌用蒙金娜培养基^[23-24];保存用 LB 培养基^[25]。

2)溶磷圈法筛选溶磷菌。将采集的 7 种禾草根系上的虚土抖掉后,按常规细菌分离法^[22]涂布样品悬液于 PKO 和蒙金娜培养基上,待菌落长出后,挑取 PKO、蒙金娜培养基上菌落大、生长快、具有明显溶磷圈的单个菌落,划线法接种于对应的培养基上,直至获得纯的单个菌落,再点接种于含难溶性磷酸钙的 PKO 和含蛋黄卵磷脂的蒙金娜固体培养基上进行溶磷菌株筛选^[22]。最后保存于 LB 斜面培养基中(4 °C)。

1.2.2 溶磷菌溶磷能力测定

1)按常规法制作磷标准曲线^[21]。

2)定性测定。将保存于 LB 斜面培养基中的菌株,活化后用接菌针挑取单个菌落点接种于 PKO 无机磷和蒙金娜有机磷平板培养基上,28 °C 恒温培养,分别在 5、7、10、14 和 16 d 时测量每个菌株形成的溶磷圈大小。根据溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)初步确定各菌株是否有溶磷能力。

3)定量测定。将 50 mL 液体 PKO 无机磷(或蒙金娜有机磷)培养基装入 150 mL 三角瓶,121 °C 灭菌 30 min,冷却后,分别将 0.5 mL 各待测菌株悬

浮液(108 cfu·mL⁻¹)接种于装有培养基的三角瓶中。每菌株分别设 3 个重复,以不接菌的基础培养基为对照。将上述三角瓶于 28 °C、160 r·min⁻¹摇床上培养 10 d 后,用酸度计测定各个培养液 pH 值。接着将培养液在转速为 10 000 r·min⁻¹的离心机上于 4 °C 离心 15 min,取上清液 5 mL 转入 150 mL 三角瓶中。用钼蓝比色法测定扣除对照后各个菌株有效磷增量(μg·mL⁻¹)^[26],其计算公式如下。

$$\text{菌株有效磷增量} = \frac{\rho \cdot V \cdot T_s}{V_0}$$

式中,ρ 为从标准曲线上查得有效磷的浓度(μg·mL⁻¹),T_s 为分取倍数,V₀ 为测定发酵液的体积(mL),V 为显色时定容体积(mL)。

1.3 数据处理

基本数据分析和绘图采用 Microsoft Excel 2003 软件,方差分析和相关性分析采用 SPSS 软件,成对比较采用 One-way ANOVA 和 LSD 法,菌株溶磷能力与 pH 之间的相关性采用 Pearson 相关分析。所有数值以平均值表示。

2 结果与分析

2.1 不同植物根际溶磷菌株数量及分布特征

2.1.1 禾草根际溶解无机磷菌株的数量及分布特征 采用 PKO 选择性培养基从 7 种供试禾草根际分离出生长较快、菌落较大、有明显溶磷透明圈的溶解无机磷菌 109 株(表 1),其中,紫花针茅根际分离到的菌株最多,占总无机磷菌株的 19.27%;糙毛鹅观草根际分离到的菌株仅次于紫花针茅,占 16.51%;从垂穗披碱草根际分离的菌株与糙毛鹅观草相近,占 15.60%左右;高原早熟禾分离到的菌株较少,占 12.84%;醉马草、赖草和冰草根际分离到的菌株数量相同,各占总无机磷菌株的 11.93%。7 种禾草根际溶解无机磷菌株数量,除醉马草呈根表土壤>根系表面>根内的分布趋势,冰草根表土壤和根内数量相同外,其他均呈现出根系表面>根表土壤>根内的分布趋势。

2.1.2 禾草根际溶解有机磷菌株的数量及分布特征 采用蒙金娜选择性培养基从 7 种供试植物根际分离得到具有生长较快、菌落较大、有明显溶磷透明圈的溶解有机磷菌 143 株(表 2),其中,高原早熟禾

表 1 溶解无机磷菌株来源及数量

Table 1 Sources and numbers of inorganic phosphate-solubilizing bacteria

寄主植物 Host plant	菌株来源 Source			总数 Total
	根表土壤 Soil adhering to roots	根系表面 Rhizoplan	根内 Histoplan	
高原早熟禾 <i>Poa alpigena</i>	4c	9cd	1b	14b
垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	3cd	12a	2ab	17ab
醉马草 <i>Achnatherum inebrians</i>	6b	4e	3a	13b
赖草 <i>Leymus secalinus</i>	3cd	8d	2ab	13b
冰草 <i>Agropyron cristatum</i>	2d	9cd	2ab	13b
紫花针茅 <i>Stipa purpurea</i>	8a	11ab	2ab	21a
糙毛鹅观草 <i>Roegneria hirsuta</i>	6b	10bc	2ab	18ab

注:同列不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。表 2、表 4、表 5 同。

Note: Different lower case letters within the same column mean significant difference at 0.05 level. The same in Table 2, Table 4 and Table 5.

表 2 溶解有机磷菌株来源及数量

Table 2 Sources and numbers of organic phosphate-solubilizing bacteria

寄主植物 Host plant	菌株来源 Source			总数 Total
	根表土壤 Soil adhering to roots	根系表面 Rhizoplan	根内 Histoplan	
高原早熟禾 <i>Poa alpigena</i>	12a	14a	2b	28a
垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	6c	8de	5a	19bc
醉马草 <i>Achnatherum inebrians</i>	5c	9cd	4a	18bc
赖草 <i>Leymus secalinus</i>	5c	7e	4a	16c
冰草 <i>Agropyron cristatum</i>	5c	8de	1b	14c
紫花针茅 <i>Stipa purpurea</i>	9b	10bc	5a	24ab
糙毛鹅观草 <i>Roegneria hirsuta</i>	8b	11b	5a	24ab

根际分离得到的菌株数量最多, 占总有机磷菌株的 19.58%; 分离自紫花针茅和糙毛鹅观草根际的菌株数量相同, 仅次于高原早熟禾, 各占 16.78%; 垂穗披碱草根际分离到的菌株居中, 占 13.27%; 醉马草根际分离到的菌株数量仅比垂穗披碱草少 1 株, 占 12.59%; 从赖草根际分离的菌株较少, 占 11.19%; 冰草根际分离到的菌株数量最少, 占 9.79%。7 种禾草根际溶解有机磷菌株数量均呈现出根系表面 > 根表土壤 > 根内的分布趋势。

2.2 菌株溶磷特征

2.2.1 分离获得的菌株 将 109 株溶解无机磷菌逐一进行编号, 每个编号前加大写字母“P”, 同理, 将 143 株溶解有机磷菌编号前加大写字母“M”(表 3); “P”和“M”后的字母“G”为高原早熟禾首字母,

“C”为垂穗披碱草首字母, “Z”为醉马草首字母, “L”为赖草首字母, “B”为冰草首字母, “ZH”为紫花针茅前两字首字母, “CM”为糙毛鹅观草前两字首字母; “RS”代表根表土壤, “RP”代表根系表面, “HP”代表根内。大于 3 个以上的用“—”表示(表 3)。

2.2.2 菌株溶磷能力的时间动态特征 利用平板溶磷圈法对平板培养基中培养的供试菌株的溶磷能力进行了测定, 结果表明, 溶解无机磷菌和有机磷菌溶磷圈大小各异。分别在 5、7、10、14、16 d 时测量各菌株形成的溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)大小, 计算其比值(D/d)。测得从糙毛鹅观草中分离出的 61.11% 溶解无机磷菌株 D/d 值在 10 d 时不再增大(图 1), 从高原早熟禾中分离出的 64.29% 溶解无机磷菌株 D/d 值在 10 d 时也不再增大(图 2), 从垂穗

表3 分离获得的菌株编号
Table 3 Code of the isolated strains

寄主植物 Host plant	溶解无机磷菌 Inorganic phosphate-solubilization bacteria	溶解有机磷菌 Organic phosphate-solubilization bacteria
高原早熟禾 <i>Poa alpigena</i>	PGRS1-PGRS4, PGRP1-PGRP9, PGHP1	MGRS1-MGRS12, MGRP1-MGRP14, MGHP1, MGHP2
垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	PCRS1, PCRS2, PCRS3, PCRP1-PCRP12, PCHP1, PCHP2	MCRS1-MCRS6, MCRP1-MCRP8, MCHP1-MCHP5
醉马草 <i>Achnatherum inebrians</i>	PZRS1-PZRS6, PZRP1-PZRP4, PZHP1, PZHP2, PZHP3	MZRS1-MZRS5, MZRP1-MZRP9, MZHP1-MZHP4
赖草 <i>Leymus secalinus</i>	PLRS1, PLRS2, PLRS3, PLRP1-PLRP8, PLHP1, PLHP2	MLRS1-MLRS5, MLRP1-MLRP7, MLHP1-MLHP4
冰草 <i>Agropyron cristatum</i>	PBRS1, PBRS2, PBRP1-PBRP9, PBHP1, PBHP2	MBRS1-MBRS5, MBRP1-MBRP8, MBHP1
紫花针茅 <i>Stipa purpurea</i>	PZHR1-PZHR8, PZHRP1-PZHRP11, PZHHP1, PZHHP2	MZHR1-MZHR8, MZHRP1-MZHRP10, MZHHP1-MZHHP5
糙毛鹅观草 <i>Roegneria hirsuta</i>	PCMRS1-PCMRS6, PCMRP1-PCMRP10, PCMHP1, PCMHP2	MCMRS1-MCMRS8, MCMRP1-MCMRP11, MCMHP1-MCMHP5

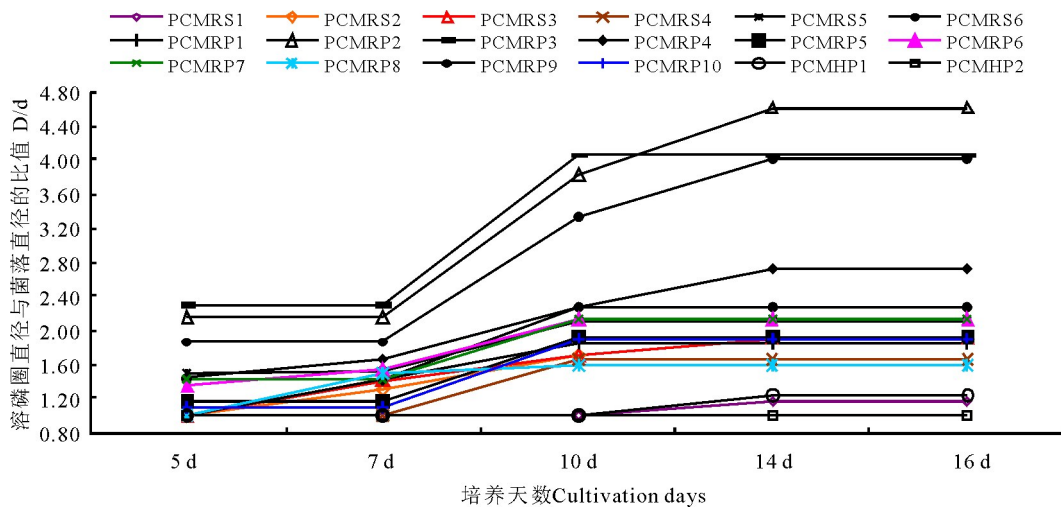


图1 糙毛鹅观草中溶解无机磷菌株溶磷动态变化

Fig.1 Changes of the inorganic phosphate-solubilization in *Roegneria hirsuta*

披碱草、醉马草、赖草、冰草、紫花针茅中分别分离出52.94%、69.23%、61.54%、53.85%、61.90%的溶解无机磷菌株的D/d值都在10d时不再增大,其余少数溶解无机磷菌株D/d值在10d以后继续增长,14d后不再增大;从赖草中分离出的93.75%溶解有机磷菌株的D/d值在14d时不再增大(图3),从垂穗披碱草中分离出的73.68%溶解有机磷菌株的D/d

值在14d时也不再增大(图4),从醉马草、高原早熟禾、冰草、紫花针茅、糙毛鹅观草中分别分离出的61.11%、82.35%、64.29%、79.17%、83.33%的溶解有机磷菌株的D/d在14d时不再变大,其余少数溶解有机磷菌株的D/d值在14d以后继续变大。

2.2.3 菌株溶磷能力特征 运用钼蓝比色法对菌株的溶磷能力进行了测定,结果表明,109株溶解无

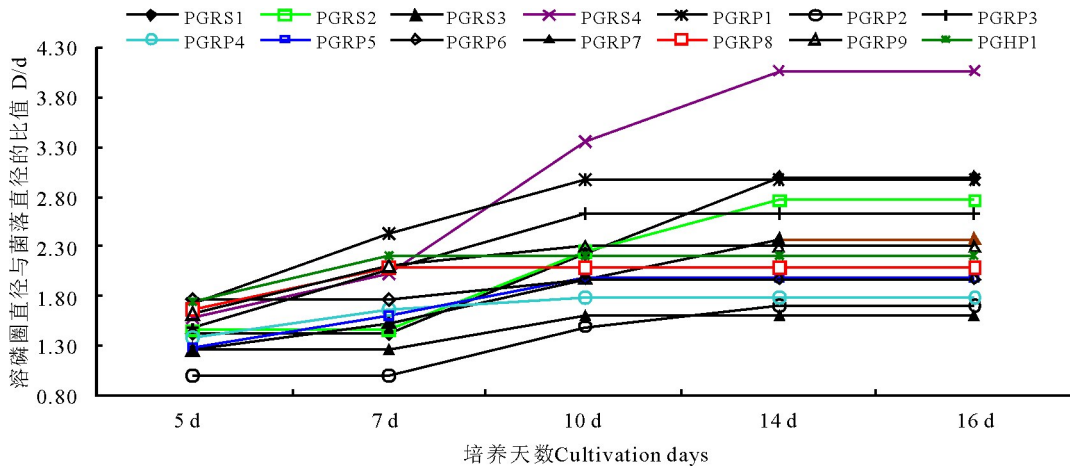


图 2 高原早熟禾中溶解无机磷菌株溶磷动态变化

Fig.2 Changes of the inorganic phosphate-solubilization in *Poa alpigena*

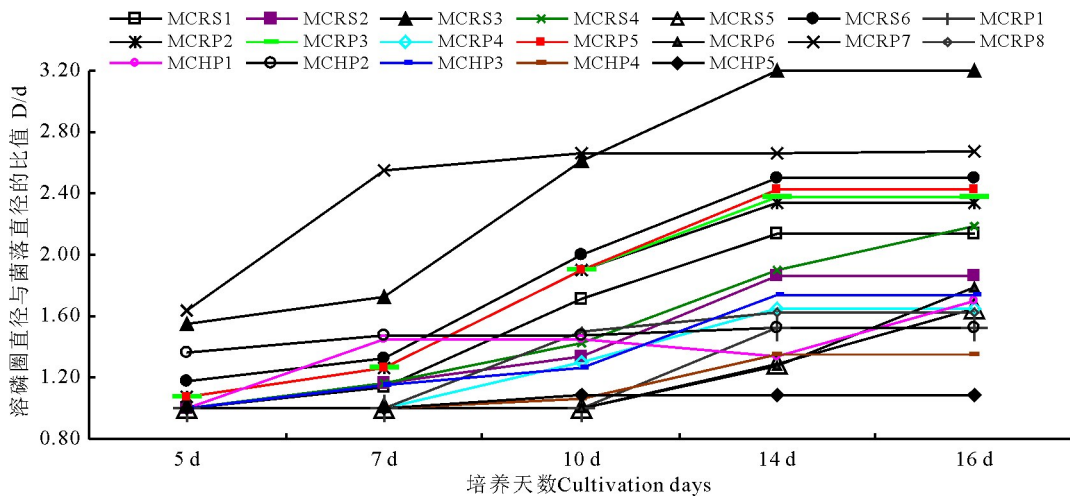


图 3 赖草中溶解有机磷菌株溶磷动态变化

Fig.3 Changes of the organic phosphate-solubilization in *Leymus secalinus*

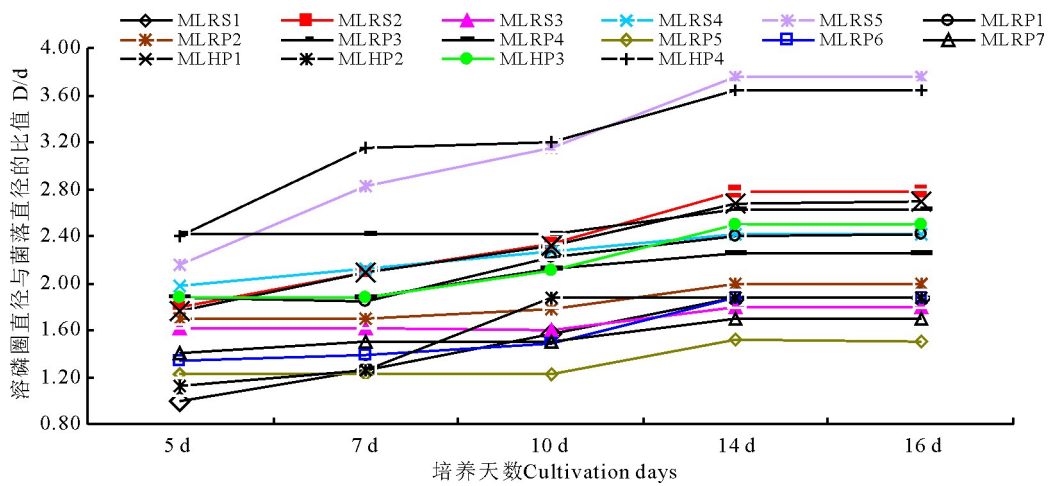


图 4 垂穗披碱草中溶解有机磷菌株溶磷动态变化

Fig.4 Changes of the organic phosphate-solubilization in *Elymus nutans*

机磷菌培养液中有效磷含量变化较大,在 $0.47 \sim 582.46 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 大于 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌株占总溶解无机磷菌株的 15.60%, 且菌株间差异显著 ($P < 0.05$), 菌株 PCR5 培养液中有效磷含量最大(表 4)。143 株溶解有机磷菌培养液中有效磷含量较低, 但各菌株间差异较大, 范围在 $0.07 \sim 14.76 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 大于 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 菌株只占总溶解有机磷菌株的 9.09%, 除 MGRS5 和 MCMRS1 无显著差异外 ($P > 0.05$), 其余菌株之间差异显著, 其中含有效磷含量最高的菌株为 MCMRS4(表 5)。

表 4 部分菌株处理溶磷量与 pH 值(PKO)

Table 4 P solubilization and pH of some strains(PKO)

菌株编号 Strains code	菌株培养液 pH pH of strain culture	溶磷量 P solubilization capacity/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
PZRP2	4.80i	444.37d
PCMHP2	4.64j	161.48m
PLRP4	5.03h	371.69g
PLHP1	5.45d	173.78l
PZHRS1	6.10c	64.14p
PZHRP1	5.36e	69.73o
PZHRS3	4.43k	319.70i
PCRS1	6.17b	54.20q
PCRP3	4.18o	467.29c
PZHRP4	5.48d	102.22n
PCRP8	5.06h	420.89f
PLRP2	4.28m	557.86b
PBRP5	4.33l	430.40e
PCRP5	4.23n	582.46a
PZHRS6	5.20g	273.29j
PCMRP2	5.26f	224.26k
PCMRS6	4.66j	362.75h
CK	6.63a	—

2.2.4 菌株溶磷能力与 pH 的相关性 溶解无机磷和溶解有机磷菌株培养液中 pH 较对照(不接菌的基础培养液)都有所降低, 运用相关性回归分析培养液中有效磷含量与 pH 的相关性, 发现蒙金娜培养基中 pH 与有机磷菌株有效磷含量无显著相关性 ($P > 0.05$), PKO 培养基中 pH 与无机磷菌株有效磷含量之间呈极显著负相关 ($P < 0.01$), 线性回归方程为: $y = -285.76x + 1768.03$, $R^2 = 0.734$ 。

表 5 部分菌株处理溶磷量与 pH 值(蒙金娜)

Table 5 P solubilization and pH of some strains(Mehkna)

菌株编号 Strains code	菌株培养液 pH pH of strain culture	溶磷量 P solubilization capacity/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
MGRS1	7.74c	6.74h
MGRS4	7.64d	5.25k
MGRS5	7.54f	5.72j
MGRS9	7.67d	12.68c
MGRR3	7.66d	5.01l
MZHP1	7.51f	14.19b
MZHP3	7.89b	6.58i
MBRS1	7.60e	9.54e
MBHP1	7.92b	8.87f
MCMRS1	7.75c	5.65j
MCMRS4	7.76c	14.76a
MCMRS5	7.59e	11.23d
MCMHP5	7.74c	8.35g
CK	8.04a	—

2.3 优良溶磷菌株的菌落特征

通过溶磷圈法和钼蓝比色法筛选出具有明显溶磷圈且溶磷能力较高的优良菌株在 LB 培养基上纯培养, 观察、记录菌落的特征发现, 各个菌株特性生长速度、颜色、形状、边缘完整度、隆起度以及表面状况表现出不同的差异性。菌株颜色除 PCR8 为黄色、PBRP5 为栗色外, 其他基本为米黄色、灰白色及乳白色 3 种颜色; 表面状况除 PLRP2 微干外, 其他菌株大体保持湿润状; 菌落形状为圆形、近圆形和椭圆形; 边缘大都为完整、波浪状或锯齿状 3 种类型; 隆起度也仅为凸起、微凸和平坦。

3 讨论与结论

3.1 不同植物根际溶磷菌数量及分布

7 种禾草根际溶解无机和有机磷菌株数量差异较大, 与各植物所处区域土壤肥力、水热状况及植物本身有关^[27]。细菌所需营养主要来源于植物残体, 不同的植物必然导致细菌在各植物中分布的不均一性^[28]。从 7 种禾草根际分离出的溶解无机和有机磷菌株的数量, 除醉马草根际溶解无机磷菌呈根表土壤 > 根系表面 > 根内, 冰草根表土壤和根内数量

相同外,其他均呈现根系表面>根表土壤>根内的分布趋势,这与张英等^[15]、姚拓^[16]的研究结果大体一致,在土壤表层和植物根系表层土壤细菌分布密集,积累的枯枝落叶和根系分泌物也多,可为细菌生长提供丰富的营养^[29]。醉马草中分离出的溶解无机磷菌的数量在根表土壤中分布最多,可能与根表土壤中微生物分泌的有机酸(如甲酸、醋酸、羟基乙酸、丙酸、乙醇酸、延胡索酸、乳酸、丁二酸等)种类、数量有关,有机酸可与土壤中的Ca、Mg、Fe、Al等元素的阳离子进行螯合作用,从而减少了可固定磷酸根的阳离子,增加了土壤磷酸根离子的活性,使难溶性磷酸盐溶解。具体原因有待进一步的研究。

3.2 不同植物根际溶磷特征

平板溶磷圈法测定菌株的溶磷能力,发现溶解无机磷和有机磷菌株的溶磷圈大小各异。溶磷圈与菌落直径大小的比值(D/d)随着时间变化而变化,大多数溶解无机磷菌株的D/d值在10 d时处于稳定状态,绝大多数溶解有机磷菌株的在14 d时趋于稳定,出现这种结果的原因,一方面与培养基中所含的磷酸钙和蛋黄卵磷脂多少有密切关系^[30-31],另一方面可能与试验中无法保证每个培养皿中均含有相同体积的培养基有关。钼蓝比色法测得不同菌株的溶磷能力差异较大,与菌株自身分泌物质的多少有关^[30-31]。

该研究中大部分无机磷可被转化成可溶性磷被

植物吸收,而绝大部分有机磷不能完全被转化为有效磷被植物吸收利用。这可作为今后研究的重点之一,因为土壤中不仅有无机磷的存在,还有大量的有机磷,如果不能被植物充分利用,相当于丢弃了大量的磷资源。筛选高效溶解磷能力的菌株为今后微生物肥料的制作提供了优势菌株资源。

溶磷微生物在呼吸过程中释放出大量的CO₂,CO₂溶于水变为碳酸,使溶解无机磷菌和溶解有机磷菌的培养液中pH值较对照(不接菌的基础培养液)降低。蒙金娜培养基pH与溶解有机磷菌株培养液中有效磷含量无显著相关性($P>0.05$),该结果与林启美等^[32]的研究一致;而PKO培养基pH与溶解无机磷菌株培养液中有效磷含量之间极显著负相关($P<0.01$),这与张英^[33]的测定结果一致。说明培养液中pH值的下降,并不是溶磷菌溶磷的唯一条件。

本研究从7种供试植物根际分离出溶解无机磷菌109株和溶解有机磷菌143株。其中109株无机磷菌株培养液中有效磷含量在0.47~582.46 μg·mL⁻¹,最大有效磷含量菌株为PCR5;143株溶解有机磷菌株培养液中有效磷含量较低,在0.07~14.76 μg·mL⁻¹,最大有效磷含量菌株为MCMRS4;溶解无机磷菌株相对于溶解有机磷菌株,有效磷含量较大。菌株溶磷特征差异较大。筛选出的部分菌株具有较大研究和开发潜力。

参考文献

- [1] 李凤霞,姚拓,张德昱.生长促生菌浸种对高寒地区燕麦生长及固氮的效应[J].草业科学,2005,23(1):22-25.
- [2] 王光华,周可琴,金剑,潘相文,赵英.不同碳源对三种溶磷真菌溶解磷矿粉能力的影响[J].生态学杂志,2004,23(2):32-36.
- [3] 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.
- [4] Kabznelson H, Peterson E A, Rouatt J W. Phosphate-dissolving microorganisms on seed and in the root zone of plants[J]. Canadian Journal of Botany, 1962, 40(9): 1181-1186.
- [5] 冯月红,姚拓,龙瑞军.土壤解磷菌研究进展[J].草原与草坪,2003(1):3-7.
- [6] 黄静,盛下放,何琳燕.具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性[J].微生物学报,2010,50(6):710-716.
- [7] 李繁.土壤中有有机磷细菌的分离鉴定及解磷突变体的筛选[D].北京:中国农业大学,2004.
- [8] Paul N B, Sundara Rao W V B. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes[J]. Plant and Soil, 1971, 35: 127-132.
- [9] 陈廷伟.微生物对不溶性无机磷化合物的分解能力及其接种效果[J].微生物,1995,2(5):210-215.

- [10] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms[J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1995, 27(3): 257-263.
- [11] 刘荣昌. 生物钾肥在农业生产中的作用[A]. 95 全国微生物肥料专业会议论文集[C]. 北京: 中国农业科技出版社, 1995: 121-125.
- [12] 蔡磊, 李文鹏, 张克勤. 高效解磷菌株的分离、筛选及其对小麦苗期生长的促进作用研究[J]. *土壤通报*, 2002, 33(1): 44-46.
- [13] Hariprasad P, Niranjana S R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato[J]. *Plant and Soil*, 2009, 316: 13-24.
- [14] 郜春花, 王岗, 董云中, 张乃明. 解磷菌剂盆栽及大田施用效果[J]. *山西农业科学*, 2003, 31(3): 40-43.
- [15] 张英, 姚拓, 朱颖. 复合接种剂对三叶草生长特性和品质影响研究[J]. *植物营养与肥料学报*, 2012, 18(5): 1277-1285.
- [16] 姚拓. 高寒地区燕麦根际联合固氮菌研究 II 固氮菌的溶磷性和分泌植物生长素特性测定[J]. *草业学报*, 2004, 13(3): 85-90.
- [17] 何福恒, 童锦秋, 金士芳, 姜秋菊. 水稻、玉米、甘蔗根系联合固氮菌的分离和鉴定[J]. *微生物学通报*, 1986, 13(1): 2-6.
- [18] 张福星, 刘永正, 龙崇杓, 林敏, 方宣钧, 卢婉芳, 陈苇. 环境因子变化对水稻氮素吸收及接种效益的影响[J]. *农业生物技术学报*, 1995, 3(1): 93-98.
- [19] Döbereiner J, Day P J, Dart P J. Nitrogenase activity and oxygen sensitivity of the *paspalum* notatum-*azotobacter paspali* association[J]. *Microbiology*, 1972, 71(1): 103-116.
- [20] Okon Y, Cohen E, Kigel J. Increase in dry weight and total nitrogen content in *Zea mays* and *Setaria italica* associated with nitrogen-fixing *azospirillum* spp. [J]. *Plant Physiology*, 1980, 66: 746-749.
- [21] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986.
- [22] Hafeez F Y, Malik K A. Manual on bio-fertilizer technology[M]. Pakistan: NIBGE, 2000.
- [23] 陈俊, 陆俊焜, 康丽华, 杨振德. 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.
- [24] 李凤霞, 姚拓, 张德罡. 燕麦根际促生菌特性研究[J]. *草业学报*, 2005, 14(1): 58-62.
- [25] 李凤霞, 姚拓, 张德罡. 高寒地区燕麦根际高效 PGPR 菌培养条件研究[J]. *甘肃农业大学学报*, 2004, 39(6): 316-320.
- [26] Smith K P, Goodman R M. Host variation for interactions with beneficial plant associated microbes[J]. *Annals of Phytopathology*, 1999, 96: 4786-4790.
- [27] 赵勇斌, 胡美蓉, 邵煜庭. 甘肃天祝永丰滩高山草原土壤肥力状况及微生物生态的研究[J]. *中国草原*, 1984(3): 65-73.
- [28] 郭继勋, 祝廷成. 羊草草原土壤微生物的数量和生物量[J]. *生态学报*, 1997, 17(1): 78-82.
- [29] 韩玉竹, 陈秀蓉, 王国荣, 杨成德, 徐长林. 东祁连山高寒草地土壤微生物分布特征初探[J]. *草业科学*, 2007, 24(4): 14-18.
- [30] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34: 33-41.
- [31] Agnihotri V P. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1970, 16(9): 877-880.
- [32] 林启美, 王华, 赵小蓉, 赵紫鹃. 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.
- [33] 张英. 西藏阿里高寒草原四种牧草根际促生菌资源筛选及促生机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.

(责任编辑 王芳)