

## 南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果

任嘉红<sup>1</sup>, 刘辉<sup>2</sup>, 吴晓蕙<sup>1</sup>, 王青<sup>1</sup>, 任英瑜<sup>1</sup>, 刘亚静<sup>1</sup>, 冯玉龙<sup>1</sup>

<sup>1</sup>长治学院生物科学与技术系, 长治 046011

<sup>2</sup>安徽师范大学环境科学与工程学院, 芜湖 241003

**摘要:** 【目的】对南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*) 根际溶无机磷细菌进行了分离、筛选与鉴定, 并对获得的高效溶磷菌株进行了温室盆栽试验。本研究为通过生物途径改善南方红豆杉磷素供应, 促进其生长提供了优良的菌株资源。【方法】利用选择培养基从南方红豆杉根际土壤中共分离出具溶磷能力的细菌; 采用 NBRI-BPB 培养基进行复筛获得溶磷能力较强的溶无机磷细菌; 并采用钼锑抗比色法测量其在 NBRIP 培养基中经 4d 发酵后的可溶性磷含量; 通过形态指标、生理生化测定、Biolog 系统和 16S rDNA 序列分析鉴定细菌种类; 并进行了溶磷菌株的室内盆栽实生苗接种试验。【结论】从南方红豆杉根际共分离出 4 株高效溶磷细菌, 分别鉴定为荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、蜡状芽胞杆菌 (*Bacillus cereus*)、草木樨中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 和地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*); 4 株细菌对南方红豆杉苗期的生长有明显的促进作用。

**关键词:** 南方红豆杉, 溶无机磷细菌, 筛选和鉴定, 促生长

中图分类号: Q939.99 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0295-09

南方红豆杉 (*Taxus chinensis* var. *mairei*) 是红豆杉科红豆杉属植物, 广布于我国南方部分地区海拔 600-1200 m 的山地, 山西是该植物生长的北限<sup>[1]</sup>, 其树冠优美, 材质坚硬、水湿不腐, 是集观赏、材用、药用于一身的珍贵树种。而且, 南方红豆杉是中国特有树种, 为第三纪孑遗树种和国家一级保护珍稀树种, 是新型抗癌天然药物紫杉醇 (Taxol) 的主要来源之一。目前, 几乎所有的紫杉醇临床用药都直接或间接地来源于红豆杉属植物的自然资源, 其它的一些尝试均没有形成产业化规模<sup>[2]</sup>, 这导致红豆杉属植物野生资源破坏严重, 红豆杉生长缓慢的生物学特性和极低的紫杉醇含量进一步加剧了这种状况<sup>[3]</sup>。

磷是植物生长发育重要的物质基础, 植物吸收磷量与植物的生物量呈显著的正相关。在我国有 74% 的耕地土壤缺磷, 土壤中 95% 的磷为无法吸收的难溶性磷, 因此如何提高植物对土壤中难溶性磷的吸收具有重要的应用价值。许多研究表明, 土壤中分布有大量具有溶磷能力的微生物, 称为溶磷微生物<sup>[4-6]</sup>。一般将具有溶解无机磷酸盐的细菌称溶无机磷细菌 (Phosphate-solubilizing bacteria, PSB)<sup>[7]</sup>。这类细菌能够促进磷灰石 [ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ] 等难溶成分释放出磷, 具有溶无机磷能力。PSB 可明显提高土壤中可溶性磷的营养水平, 增加植物对磷元素的吸收, 从而促进植物的生长<sup>[8]</sup>。目前国内外尚未开展南方红豆杉根际溶无机磷细菌的系统研究。

基金项目: 国家自然科学基金 (31100471); 山西省高校高新技术产业化资助项目 (2110122)

作者简介: 任嘉红 (1976-), 博士, 副教授, 主要从事森林微生物的研究。E-mail: renjiahong76@yahoo.com.cn

收稿日期: 2011-11-09; 修回日期: 2011-12-30

本文以南方红豆杉根际土为研究对象,对南方红豆杉根际土的溶无机磷细菌进行了分离筛选,得到了4株高效溶无机磷细菌,并对这4株溶磷细菌进行了鉴定;同时在温室条件下,研究了4株高效溶磷细菌对南方红豆杉实生苗苗期生长的影响。该研究结果可为南方红豆杉高效生物肥料的研制提供优良的菌种资源,对南方红豆杉珍贵野生资源的保护和紫杉醇产业的可持续发展具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 土样:**选择山西省南方红豆杉分布区(陵川凤凰谷、长治大峡谷、蟒河自然保护区、历山自然保护区、长治林业局院内、长治宾馆院内、长治林业局苗圃)中长势良好的南方红豆杉。采用三点取样法,铲去表土,将南方红豆杉10-20 cm的根系及黏附其上的土壤一同装入无菌袋中,注明采集地点、日期、土样号,带回实验室及时进行溶无机磷细菌的分离。

**1.1.2 培养基:**①溶无机磷细菌的分离、纯化培养基(选择培养基)<sup>[9]</sup> ②溶无机磷细菌保藏培养基(NA):牛肉膏3 g,蛋白胨10 g,NaCl 5 g,琼脂18 g,蒸馏水1000 mL,pH 7.2-7.4。③溶无机磷细菌种子及培养培养基(NB):配方同NA(不添加琼脂)。④溶无机磷细菌筛选培养基(NBRI-BPB)<sup>[10]</sup> ⑤溶磷能力测定培养基(NBRIP)<sup>[10]</sup>:配方同NBRI-BPB(不添加溴酚蓝)。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**①试剂:钼酸铵、酒石酸锑钾、抗坏血酸、浓硫酸、乙醇、2,4-二硝基酚、Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>等均为国产分析纯。溶液的配制及稀释均采用Milli-Q超纯水。②仪器:Leica DM5000B荧光显微镜、德国Eppendorf Centrifuge 5804R高速低温离心机、UNICO UV2000紫外分光光度计和Millipore超纯水系统。

**1.2 南方红豆杉根际溶无机磷细菌分离、纯化及筛选**

**1.2.1 溶无机磷细菌的分离、纯化及保藏:**溶无机磷细菌的分离采用平板梯度稀释培养法。将涂布有南方红豆杉根际土悬浮液的分离平板置于30℃培养4-7 d,挑取平板上产磷溶圈且形态有明显区别的菌落纯化多次,直至通过平板和镜检观察确定其

为纯培养物后,挑取单菌落转至NA斜面培养2-3 d,然后置于4℃冰箱保存。

**1.2.2 溶无机磷细菌的复筛:**参照Sangeeta Mehta和Nautiyal的方法<sup>[10]</sup>(略有修改),用接种环挑取1.2.1分离获得的细菌菌株,接种于装有20 mL NBRI-BPB培养基的100 mL三角瓶中,以未接种空白NBRI-BPB培养基为对照,30℃,180 r/m振荡培养3 d,发酵液(4℃,12857 × g)离心10 min,在波长600 nm处测定上清液OD<sub>600</sub>值,对其溶磷能力进行初步分级。分级标准为溶磷能力强(+++):OD<sub>600</sub> ≤ -1;较强(++):-1 < OD<sub>600</sub> ≤ -0.5;弱(+):-0.5 < OD<sub>600</sub> ≤ -0.1。

**1.3 溶无机磷细菌溶磷能力的测定**

选取1.2.2中OD<sub>600</sub> ≤ -1的溶磷菌株活化后接种于NB种子培养基,30℃振荡培养18-24 h制成种子液,取0.5 mL种子液接种于含50 mL NBRIP培养液的100 mL三角瓶中,以接0.5 mL空白种子液的NBRIP培养基为对照,每个处理3个重复,30℃,180 r/m振荡培养4 d后,发酵液(4℃,12857 × g)离心10 min,采用钼锑抗比色法测定上清液有效磷含量<sup>[11]</sup>,同时计算溶磷率<sup>[12]</sup>;并测定上清液pH值。

**1.4 溶无机磷细菌的鉴定**

**1.4.1 理化性质及形态学分类:**按照文献[13]做形态与生理生化分析。

**1.4.2 Biolog系统鉴定:**具体步骤参照该系统的鉴定说明书。

**1.4.3 16S rDNA序列分析:**按文献<sup>[14]</sup>提取细菌的基因组DNA,采用扩增细菌16S rDNA的通用引物(正向引物27 F:AGAGTTTGATCCTGGCTCAG;反向引物1512 R:ACGGCTACCTGTTCAGACT)对细菌基因组DNA进行扩增<sup>[15]</sup>。获得的PCR产物,经1%琼脂糖凝胶电泳分离后送Invitrogen公司测序。测序完成后,将得到的序列登陆EzTaxon server(<http://www.EzTaxon.org>)进行BLAST<sup>[16]</sup>,选取数据库中有代表性的菌株16S rDNA,采用Bioedit软件的Multiple Sequence Alignment程序进行分析,并利用软件MEGA5.05构建系统发育树(Bootstrap = 1000)。

**1.5 溶无机磷细菌的温室试验**

将4株高效溶磷菌株活化后,用接种环挑取少量菌体接种于装有50 mL NB培养基的100 mL三角瓶中,29℃,200 r/min振荡培养48 h。发酵液(4℃,

4629 × g) 离心 5 min, 无菌生理盐水润洗菌体 3 次后, 无菌生理盐水调节菌悬液 ( $10^8$  cfu/mL) 制成接种剂。接种南方红豆杉实生苗 (苗龄 60 d), 以等量无菌生理盐水为对照, 接种量为实生苗 5 mL/株。每处理 6 个重复, 置温室中培养, 光照通过遮阳网得到一定控制, 不使用人工光源, 适时浇水。实生苗培养培养基质为 V(泥炭):V(珍珠岩):V(沙) = 3:1:1 的混合基质, 每盆 1.5 kg, 基质中速效氮含量 35.0 mg/kg, 速效磷含量 7.0 mg/kg, 速效钾含量为 25.4 mg/kg。南方红豆杉接种后 150 d 后测定苗高、地径。

### 1.6 数据分析

采用 SPSS V13.0 统计软件进行方差分析和多重比较。

## 2 结果和分析

### 2.1 南方红豆杉根际溶磷细菌的分离与筛选

用选择培养基平板分离所采集的南方红豆杉根际土中的溶磷细菌, 获得 45 株能产生溶磷圈的细菌, 说明这些菌株具有溶无机磷能力。其中从陵川凤凰谷土样中获得 8 株, 长治大峡谷 6 株, 蟒河自然保护区 10 株, 历山自然保护区 9 株, 长治林业局院内 5 株, 长治宾馆院内 4 株, 长治林业局苗圃 3 株。

利用 Sangeeta Mehta 和 Nautiyal 的方法对 45 株溶无机磷细菌进行定性和半定量溶磷能力的测定, 结果表明有 11 株菌株在 NBRI-BPB 培养基中的发酵液上清液于波长 600 nm 处的光吸收值均  $< -1$ , 属于溶磷能力初步分级标准中的最高级 (表 1), 具有应用潜力。该方法原理为溶磷细菌分泌有机酸降低培养基质的 pH 值, 从而达到溶磷的目的。溴酚蓝 (BPB) 作为一种酸碱指示剂, 随着介质 pH 降低而褪色, pH 变色范围 3.0 (黄) - 4.6 (蓝紫)。因此, 在 NBRI-P 中添加一定量 BPB, 利用发酵液褪色程度的不同可以定性和半定量的反应细菌溶磷能力的大小。从表 1 可看出, 与对照相比, 11 株溶磷细菌发酵液  $OD_{600}$  值在  $-1.001 - -2.050$  之间。这说明 11 株溶磷细菌能够分泌大量有机酸降低了培养介质 pH 值从而使 BPB 褪色。根据发酵液  $OD_{600}$  值的不同, 各菌株产酸能力排序为菌株 CLW17 > CHB10B > CHB10L > JFW3 > MHW04 > JFW01 > JFW13 > MHW07 > CLW02 > LSW08 > CFW07。

### 2.2 溶磷细菌溶磷能力测定

将 2.1 中初筛获得的 11 株溶磷细菌分别接种于 NBRI-P 培养基中, 29℃, 180 r/m 振荡培养 4 d 后, 各接菌处理发酵液有效磷含量均明显高于对照 (24.67 mg/L), 不同处理间差异显著 (见表 2)。11 株溶磷细菌处理发酵液有效磷含量在 357.21 mg/L - 647.67 mg/L 之间, 溶磷率介于 6.65% - 12.46%。如表 1 所示, 菌株 CLW17、JFW3、CHW10B 和 CHW10L 溶磷能力明显高于其它菌株, 有效磷含量分别高达 647.67 mg/L、635.21 mg/L、638.86 mg/L 和 622.12 mg/L, 溶磷率分别为 12.46%、12.28%、12.21% 和 11.95%。

溶磷细菌在 NBRI-P 液体培养基中摇培 4 d 后, 各处理 pH 值均比对照有不同程度的降低, 在 3.80 - 4.40 之间 (表 2)。相关分析表明, 发酵液 pH 值 (X) 与有效磷含量 (Y) 呈极显著负相关 ( $r = -0.922^{**}$ ,  $P < 0.01$ ), 线性回归方程为  $Y = -205.3X + 1385.8$ 。以上结果表明, 初筛获得的 11 株溶磷菌株产生的酸性物质有助于这些菌株溶磷能力的提高。

溶磷菌株在 NBRI-BPB 液体摇培 4 d 后, 发酵液  $OD_{600}$  值与有效磷含量之间存在一定的相关性。相关分析表明, 发酵液  $OD_{600}$  值 (X) 与有效磷含量 (Y) 呈极显著负相关 ( $r = -0.914^{**}$ ,  $P < 0.01$ ), 线性回归方程为  $Y = -300.55X + 107.67$ 。这说明采用 NBRI-BPB 培养基摇培 4 d 后测定发酵液  $OD_{600}$  值可以相对准确、快速的从大量的供试溶磷菌株中筛选出具有溶磷能力较强菌株, 在一定程度上大大减少后续复筛的工作量。

### 2.3 高效溶磷细菌的鉴定

**2.3.1 溶磷细菌的形态特征:** 对 4 株高效溶磷细菌的细胞形态和菌落特征进行观察, 可以看出, 菌株 CLW17 和 CHW10B 为无芽孢革兰氏阴性 ( $G^-$ ) 短杆菌, 菌落圆形、边缘整齐, 表面湿润粘稠; 菌株 JFW3 和 CHW10L 为芽孢革兰氏阳性 ( $G^+$ ) 短杆菌, 菌落圆形、表面干燥; 菌落表面除菌株 CLW17 菌落为浅黄色外, 其余菌株均为乳白色; 4 株溶磷菌株均具有运动型, 菌株 JFW3 和 CHW10L 为周生鞭毛, 菌株 CLW17 和 CHW10B 极生 1 - 3 根鞭毛。

**2.3.2 溶磷细菌的生理生化特性:** 对 4 株高效溶磷细菌的各项生理生化鉴定项目包括: 氧化酶、接触酶、明胶水解、淀粉水解、丙二酸盐利用、柠檬酸盐利

用、吲哚试验、M. R. V. P、硝酸盐还原、脓青素和荧光色素的检出、卵磷脂酶等。菌株 CLW17、JFW3、CHW10B 和 CHW10L 的各项生理生化鉴定结果见表 2。每个生理生化鉴定实验重复 3 次,结果稳定;其中分别将四株南方红豆杉根际高效溶磷细菌在 King's B 平板上划线,置 30℃,培养 24 h 后,菌株 CLW17 菌落周围产生可扩散的色素,在波长 366 nm 紫外光下菌落呈现浅绿色荧光,菌落周围显示青色物质蓝色荧光(图 1-A);菌体在荧光显微镜下观察具自发荧光(图 1-B),而另外三株溶磷细菌则无此特性。以上说明菌株 CLW17 极有可能是能够自发荧

光的荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)。

**2.3.3 溶磷细菌的 Biolog 鉴定:**4 株高效溶磷细菌在 Biolog 鉴定板培养 16 - 24 h 时的读数相似值(SIM 值)均大于 0.50,符合 Biolog 系统关于理想结果的要求,菌株 CLW17、JFW3、CHW10B、CHW10L 分别鉴定为荧光假单胞(*P. fluorescens*)、蜡状芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、草木樨中华根瘤菌 [*Sinorhizobium (Ensifer) meliloti*] 和地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*)。该结果与形态特征、生理生化鉴定结果一致。

表 1 11 株溶磷细菌的初筛和溶磷能力测定

Table 1 The Determination of phosphate-dissolving ability of 11 strains of PSB

| Strain | OD <sub>600</sub> | pH value | Available phosphorus content/(mg/L) | Phosphorus-dissolving rate/% | The site of isolation                   |
|--------|-------------------|----------|-------------------------------------|------------------------------|---|
| CMW07  | -1.001 f          | 4.31 bed | 357.21 e                            | 6.65                         | the nursery of Changzhi Forestry Bureau |
| CLW02  | -1.077 ef         | 4.35 bed | 474.32 c                            | 8.99                         | the yard of Changzhi Forestry Bureau    |
| CLW17  | -2.050 a          | 3.80 g   | 647.67 a                            | 12.46                        | the yard of Changzhi Forestry Bureau    |
| JFW01  | -1.234 cd         | 4.27 d   | 573.12 b                            | 10.97                        | Fenghuang Canyon of Lingchuan           |
| JFW3   | -1.312 c          | 3.98 f   | 635.21 a                            | 12.21                        | Fenghuang Canyon of Lingchuan           |
| JFW13  | -1.195 cde        | 4.30 cd  | 489.67 c                            | 9.30                         | Fenghuang Canyon of Lingchuan           |
| CHW10B | -1.921 ab         | 3.90 f   | 638.86 a                            | 12.28                        | Daxia Canyon of Changzhi                |
| CHW10L | -1.872 b          | 3.96 f   | 622.12 a                            | 11.95                        | Daxia Canyon of Changzhi                |
| MHW04  | -1.236 cd         | 4.15 e   | 552.77 b                            | 10.56                        | Menghe                                  |
| MHW07  | -1.149 def        | 4.38 bc  | 408.24 d                            | 7.67                         | Lishan                                  |
| LSW08  | -1.035 f          | 4.40 b   | 401.12 d                            | 7.52                         | Lishan                                  |
| CK     | 0 g               | 6.83 a   | 24.67 f                             | /                            | /                                       |

Date with different letters are significantly different at 0.05 level in the same according to a LSD test.

**2.3.4 16S rDNA 鉴定:**以菌株 CLW17、JFW3、CHW10B、CHW10L 的总 DNA 为模板,使用一对细菌通用引物分别扩增出长约 1500 bp、1515 bp、1448 bp 和 1403 bp 的片段,将所测 16S rDNA 序列登陆 <http://www.EzTaxon.org> 进行 BLAST 比对,获得同源性数值,运用 ClustalX 软件进行分析,形成一个多重复匹配阵列,利用 MEGA5.05 采用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。4 个菌株通过 BLAST 比对,都能在数据库中找到同源性非常高的相似菌株序列。菌株 CLW17、JFW3、CHW10B、CHW10L 分别与假单胞菌属、芽胞杆菌属、中华根瘤菌属(剑菌属)和芽胞杆菌属具有较高的序列相似性。从图 2 的发育树可以看出,菌株 CLW17、JFW3、CHW10B、CHW10L 得遗传进化距离分别与 *P. fluorescens*、*B. cereus*、*S. meliloti* 和 *B. licheniformis* 亲缘关系较近。因此,综合 4 株溶磷细菌的培养特征、生理生化特性、Biolog 鉴定和系统发育分析结果,分别将

CLW17、JFW3、CHW10B、CHW10L 准确鉴定为 *P. fluorescens*、*B. cereus*、*S. meliloti* 和 *B. licheniformis*。

表 2 高效溶磷细菌生理生化特性

Table 2 The Physiological and biochemistry characteristics of the five efficient PSB strains

| Strains                 | CLW17 | JFW3 | CHW10B | CHW10L |
|-------------------------|-------|------|--------|--------|
| Demand for oxygen       | +     | +    | +      | +      |
| Oxidase                 | +     | -    | +      | -      |
| Catalase                | +     | +    | +      | +      |
| Gelatine liquefaction   | +     | -    | -      | +      |
| Starch                  | -     | +    | -      | +      |
| Propionate utilizing    | +     | +    | -      | +      |
| Citrate utilization     | +     | +    | -      | -      |
| Indole reduction        | +     | +    | -      | +      |
| Methyl red              | -     | -    | -      | -      |
| Voges-proskauer         | +     | +    | +      | +      |
| Nitrate production      | +     | -    | +      | +      |
| Pyocyanine production   | -     | -    | -      | -      |
| Fluorochrome production | +     | -    | -      | -      |
| Lecithinase             | -     | +    | -      | -      |

"-" means negative; "+" means positive.

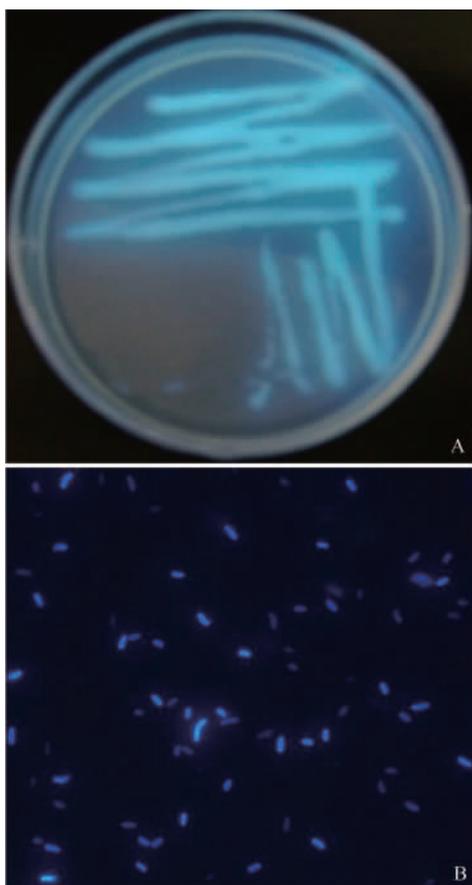


图1 菌株 CLW17 荧光特性

Fig. 1 The Feature of Fluorescence of CLW17 strain under UV (366nm) (A) and under Fluorescence Microscope by Leica DM5000B(B).

## 2.4 高效溶磷菌株对南方红豆杉实生苗的促生作用

在温室条件下,将溶磷效果最好的菌株 CLW17、JFW3、CHW10B 和 CHW10L 分别接种于南方红豆杉实生苗,接种后 150 d 测定苗高和地径。结果如表 3 显示,接种处理苗木的苗高和地径均超过了不接种处理对照。尤其是苗高,接种处理显著高于未接种处理。以上说明 4 株高效溶磷细菌对南方红豆杉苗期具有明显的促生长作用。

## 3 结论和讨论

利用微生物途径调动土壤中磷的有效性,可提高土壤中可溶性磷的营养水平,减少磷肥资源的浪费。因此,如何提高土壤中有效磷含量,已成为当前的研究热点。近年来,将溶磷微生物制成土壤磷素

活化剂用来提高植物磷素利用率成为国内外研究热点。溶磷微生物除了能够使土壤中有效磷含量提高,还能够改善土壤环境<sup>[6]</sup>。但溶磷微生物种类繁多、溶磷机制复杂,溶磷微生物施入土壤后易受到土壤性质、根际环境和植物种类等方面的影响,往往难以发挥出高效的溶磷能力。因此,从特定植物的根际环境中进行筛选,以获得与植物亲和性好、易于在植物根际定殖的溶磷微生物菌株是当前有待于加强的研究方向。

目前,有关溶磷微生物的分离、筛选和应用的研究大都局限于农作物,在林木根际筛选和应用溶磷微生物的报道极少。Liu 等从我国不同地区杨树根际筛选获得多株溶无机磷细菌和溶有机磷细菌<sup>[17]</sup>。南方红豆杉在我国分布广泛,土壤微生物资源丰富,因此,从南方红豆杉根际土壤中分离、筛选高效溶磷细菌,研究高效微生物菌肥,对调节土壤磷素的供需矛盾,促进南方红豆杉人工林的生长和紫杉醇产业的可持续性发展具有重要意义。

溶磷细菌在土壤中分布广泛,其中溶磷能力比较强的主要是芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。芽胞杆菌包括蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*)、地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*)、坚强芽胞杆菌 (*B. firmus*)、枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*)、短小芽胞杆菌 (*B. pumilis*) 和巨大芽胞杆菌 (*B. megaterium*) 等;假单胞菌主要包括荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*)、丁香假单胞菌 (*P. syringae*)、恶臭假单胞菌 (*P. putida*)、铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 等。

本研究从南方红豆杉根际共分离获得 4 株高效溶无机磷菌株 CLW17、JFW3、CHW10B 和 CHW10L,进行包括形态学特征、生理生化特性、Biolog 系统鉴定及 16S rDNA 基因序列分析,分别鉴定为荧光假单胞菌 (*P. fluorescent*)、蜡状芽胞杆菌 (*B. cereus*)、草木樨中华根瘤菌 (*S. meliloti*) 和地衣芽胞杆菌 (*B. licheniformis*)。这 4 种溶磷细菌均有报道,是溶磷细菌中较具应用潜力的菌种。温室接种试验结果表明从南方红豆杉根际分离到得 4 株溶磷细菌对南方红豆杉的苗期有较好的促生长效应。因此,可以将这 4 株溶磷菌株作为研制南方红豆杉专用溶磷细菌肥料的重点资源菌株。另外,4 株高效溶磷菌株对南方红豆杉的长期接种效应及其促生机制还有待于进一步深入研究。

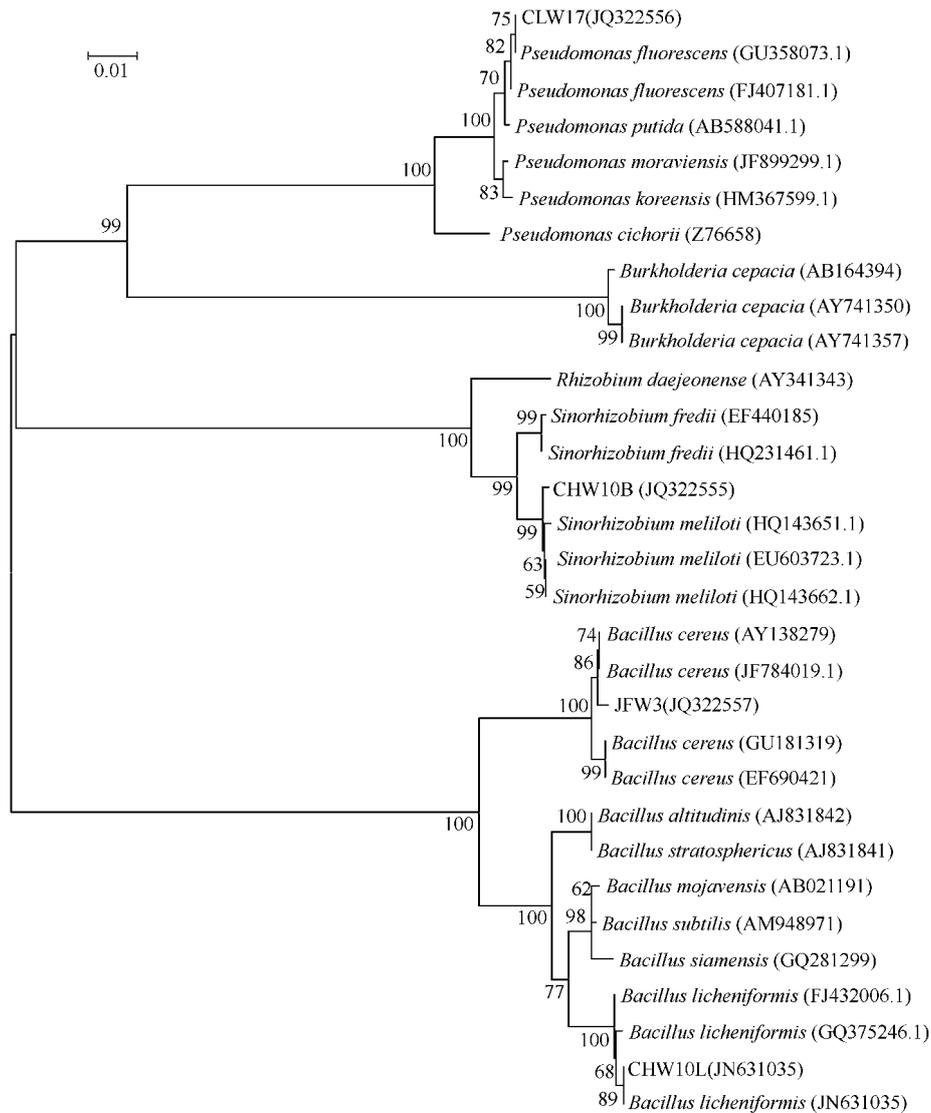


图2 依据 16S rDNA 基因序列构建的 4 株高效溶磷菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of four efficient PSB strains. Numbers at the nodes are the bootstrap confidence values obtained after 1000 replicates. The scale bar corresponds to 0.01 substitutions per nucleotide position. The GenBank accession numbers for nucleotide sequence data are shown in the brackets.

表3 4 株高效溶磷细菌对南方红豆杉实生苗生长的影响

Table 3 Effect of four efficient PSB strains on seedling growth of *Taxus chinensis* var. *mairei*

| Strains | Ground Diameter/mm | Rate of increase /% | Plant height/mm | Rate of increase /% |
|---------|--------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| CLW17   | 2.14 ± 0.24ab      | 7.91                | 81.21 ± 5.30b   | 18.45               |
| JFW3    | 2.18 ± 0.37abc     | 9.74                | 79.95 ± 3.39b   | 16.61               |
| CHW10B  | 2.29 ± 0.32bc      | 15.01               | 83.29 ± 4.53b   | 21.49               |
| CHW10L  | 2.46 ± 0.36c       | 23.56               | 82.01 ± 4.91b   | 19.62               |
| CK      | 1.99 ± 0.24a       | /                   | 68.56 ± 7.35a   | /                   |

Data with different letters are significantly different at 0.05 level in the same according to a LSD test.

目前,微生物的溶磷机制存有多种观点,一般认为是微生物向周围分泌质子、有机酸等物质。

有机酸既能降低 pH 值,又可与  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  等离子螯合,从而使难溶性无机磷转化为可溶

性磷<sup>[18]</sup>。本文发现溶磷细菌溶磷量随 pH 下降而增加,两者存在显著负相关关系,这与王岳坤<sup>[19]</sup>、Seshadri S<sup>[20]</sup> 研究结果基本一致;而林启美等<sup>[21]</sup> 研究认为培养介质 pH 值降低是溶磷的重要条件,但不是必要条件;Thomas<sup>[22]</sup>、Varsha<sup>[23]</sup> 和杨慧<sup>[24]</sup> 等的研究结果表明培养液的 pH 值下降与溶磷微生物的溶磷量无直接关系;易艳梅<sup>[25]</sup> 研究指出,微生物分泌的多糖类物质在微生物溶磷过程中发挥着重要作用。以上有关溶磷微生物溶磷机制的观点多是基于研究中所采用的溶磷微生物菌株得出。本研究中初筛选得到的 11 株溶磷细菌对难溶性无机磷源的溶磷能力与发酵液 pH 存在负相关关系,该结果与所采用 Sangeeta Mehta 和 Nautiyal 筛选体系是分不开的。采用该体系进行初筛可以相对快速的从南方红豆杉根系获得优良的高效溶磷菌株,但许多研究表明溶磷微生物的溶磷机制复杂,不同的溶磷微生物存在不同的溶磷机制。因此该体系虽能快速获得优良溶磷菌株,但极有可能漏筛了许多溶磷机制与有机酸分泌无关或关系不密切的优良菌株。在今后的筛选工作中,应该进行更多筛选体系的摸索,尽量采用多种筛选体系才能更科学、更全面的获取大量优良的溶磷菌株。另外,有关本研究中所采用的 4 株高效溶磷细菌的溶磷机理尚需开展更深入的研究。

丛枝菌根真菌 (Arbuscular Mycorrhizal Fungi, AMF) 也是土壤微生物中重要的成员之一。本研究室前期研究发现,AMF 可侵染南方红豆杉根部形成典型的丛枝菌根<sup>[26]</sup>。近年来,许多研究已经观察到 AMF 与植物次生代谢的相关性,AMF 能够直接或间接地影响植物的次生代谢过程。目前在药材栽培研究中应用 AMF 技术已经逐渐引起人们的重视<sup>[27-28]</sup>。作为土壤微生物家族的成员,溶磷细菌与菌根真菌之间有很多方面是相互影响的。一些学者开展了溶磷细菌与菌根真菌的相互作用及其对宿主植物生长和养分吸收影响的研究,指出溶磷细菌与菌根真菌互作在增加磷素吸收和植物的促生作用上优于单一接种时的效果<sup>[29]</sup>。在今后的研究中,可开展南方红豆杉高效溶磷细菌和 AMF 人工接种的相关研究工作,为研制高效复合型微生物菌剂,通过生物途径提高南方红豆杉繁殖率以及紫杉醇资源瓶颈问题提供重要的理论指导和实践应用价值。

## 参考文献

- [1] 张桂萍,张建国,茹文明. 山西蟒河南方红豆杉群落和种群结构研究. 山西大学学报(自然科学版) (*Journal of Shanxi University (Natural Science Edition)*), 2003, 26(2): 169-172.
- [2] Collin HA. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 2001, 34: 119-134.
- [3] 高银祥,于景华,祖元刚,张学科,常影,庞海河. 不同激素处理对南方红豆杉扦插苗的影响. 中国农学通报 (*Chinese Agricultural Science Bulletin*), 2009, 25(1): 93-96.
- [4] Bojinova D, Velkova R, Ivanova R. Solubilization of Morocco phosphorite by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2008, 99: 7348-7353.
- [5] Oliveira CA, Alves VMC, Marriel IE, Gomes EA, Scotti MR, Carneiro NP, Guimarães CT, Schaffert RE, Sá NMH. Phosphate solubilizing microorganisms isolated from rhizosphere of maize cultivated in an oxisol of the Brazilian Cerrado Biome. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41: 1782-1787.
- [6] 朱培森,杨兴明,徐阳春,欧阳红,沈其荣. 高效溶磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用. 应用生态学报 (*Chinese Journal of Applied Ecology*), 2007, 18(1): 107-112.
- [7] Chung H, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. *Soil Biology & Biochemistry*, 2005, 37: 1970-1974.
- [8] Hameeda B, Harini OP, Rupela OP, Wani SP, Reddy G. Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiological Research*, 2008, 163(2): 234-242.
- [9] 赵小蓉,林启美,李保国. 溶磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2002, 42(2): 104-109.
- [10] Mehta S, Nautiyal CS. An Efficient Method for Qualitative Screening of Phosphate-Solubilizing Bacteria. *Current Microbiology*, 2001, 43: 51-56.
- [11] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 北京: 中国农业科技出版社, 2000

- [12] 李娟, 王文丽, 卢秉林, 郭天文. 甘肃省河西高钙土溶磷菌筛选及其溶磷能力初步研究. 干旱地区农业研究 (*Agricultural Research in the Arid Areas*), 2008, 26(2): 8-9.
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [14] Sambrook J, Fritsch ED, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001: 155-164.
- [15] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1992, 173: 697-703.
- [16] Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57, 2259-2261.
- [17] Liu H, Wu XQ, Ren JH, Ye JR. Isolation and identification of phosphobacteria in poplar rhizosphere from different regions of China. *Pedosphere*, 2011, 21(1): 90-97.
- [18] 冯月红, 姚拓, 龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展. 草原与草坪 (*Grassland and Turf*), 2003, (1): 3-7.
- [19] 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. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49(1): 64-71.
- [20] Seshadri S, Ignacimuthu S, Lakshminarasimhan C. Effect of nitrogen and carbon sources on the inorganic phosphate solubilizing by different *Aspergillus niger* strains. *Chemical Engineering Communications*, 2004, 191(8): 1043-1052.
- [21] 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. 微生物学通报 (*Microbiology*), 2001, 28(2): 26-29.
- [22] Thomas GV. Occurrence and ability of phosphate-solubilizing fungi from coconut plant soils. *Plant and Soil*, 1985, 87: 357-364.
- [23] Varsha N, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biochemistry*, 2000, 32: 559-565.
- [24] 杨慧, 范丙全, 龚明波, 李全霞. 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. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2008, 48(1): 51-56.
- [25] 易艳梅, 黄为一. 产多糖溶磷细菌对难溶性 Ca-P 的活化特性. 南京农业大学学报 (*Journal of Nanjing Agricultural University*), 2008, 31(2): 49-54.
- [26] 任嘉红, 张静飞, 刘瑞祥, 李玉琴. 南方红豆杉丛枝菌根 (AM) 的研究. 西北植物学报 (*Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*), 2008, 28(7): 1468-1473.
- [27] 谭钜发, 黄京华, 扶蓉, 杜金子. 接种 AM 真菌对四种药用植物生长的影响研究初报. 中药材 (*Journal of Chinese Medicinal Materials*), 2009, 32(6): 843-845.
- [28] Hortencia GMV, Omar OJ, Luc D, Gerardo MS, Jaquelina GC, Fred TD, Víctor OP. Arbuscular mycorrhizal fungi enhance fruit growth and quality of chile ancho (*Capsicum annum* L. cv *San Luis*) plants exposed to drought. *Mycorrhiza*, 2006, 16: 261-267.
- [29] Barea JM, Azcon R, Hayman DS. Possible synergistic interactions between Endogone and phosphate-solubilizing bacteria in low-phosphate soils. In: Sanders FE, Mosse B, Tinker PB (eds) *Endomycorrhizas*. Proc Symp Univ Leeds. New York: Academic Press, 1975

# Screening , identification , and promoting effect of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Taxus chinensis* var. *mairei*

Jiahong Ren<sup>1\*</sup> , Hui Liu<sup>2</sup> , Xiaohui Wu<sup>1</sup> , Qing Wang<sup>1</sup> , Yingyu Ren<sup>1</sup> , Yajing Liu<sup>1</sup> , Yulong Feng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biological Science and Technology , Changzhi College , Changzhi 046011 , China

<sup>2</sup>College of Environmental Science and Engineering , Anhui Normal University , Wuhu 214000 , China

**Abstract:** [Objective] Phosphate-solubilizing bacteria (PSB) were isolated , screened and identified from the rhizosphere of *Taxus chinensis* var. *mairei* , and growth-promoting effects on *T. chinensis* var. *mairei* by high effective PSB were determined. [Methods] By using selective culture media , PSB were isolated from rhizospheric soil , the high effective PSB was further screened using NBRI-BPB medium , and the molybdenum-antimony anti-spectrophotometric method was applied to determine the phosphate-dissolving ability of the high effective PSB after four days fermentation in NBRIP medium. Bacteria were identified by the Biolog system combined with 16S rDNA gene sequence analysis and morphological , physiological and biochemical characteristics. The inoculation test in potted seedlings was carried out under the greenhouse. [Conclusion] Four strains of high effective PSB were screened and identified as *Pseudomonas fluorescens* , *Bacillus cereus* , *Sinorhizobium meliloti* and *Bacillus licheniformis* , respectively. These strains had significant effects on improving the growth of the seedlings of *T. chinensis* var. *mairei*.

**Keywords:** *Taxus chinensis* var. *mairei* , phosphate-solubilizing bacteria , screening and identification , promoting effect

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Natural National Science Foundation of China (31100471) and by the Program for Higher school Hi-tech Industry of Shanxi Province (2110122)

\* Corresponding author. Tel: +86-355-2205276; E-mail: Renjiahong@163.com

Received: 9 November 2011 / Revised: 30 December 2011

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上,并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内,“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。