

海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定

王岳坤, 于飞, 唐朝荣*

(中国热带农业科学院橡胶研究所, 儋州 571737)

摘要 【目的】了解海南酸性土壤解磷细菌溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 FePO_4 特性, 筛选高效稳定的解磷菌株, 为应用研究提供菌源。【方法】采集海南 21 种植物的根际土样品, 用营养琼脂、结晶紫-营养琼脂、酵母粉-甘露醇琼脂稀释涂布法分离土壤细菌, 选取平板上菌落形态有明显区别的代表性菌落, 用最低营养琼脂进行纯化; I 筛用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 固体培养基培养 5 d, 挑取有溶磷圈的菌落; II 筛用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养液在 32℃、200 r/min 条件培养 6 d, 挑取解磷量大于 200 mg/L 的菌株; III 筛是在 4 次继代培养及每次 15 d 的 4℃ 保藏后, 用 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养液培养 6 d, 挑取解磷量大于 200 mg/L 的菌株。称 III 筛的选出菌株为高效稳定的解磷细菌 (PSBHS), 用 FePO_4 培养液对 PSBHS 培养 6 d, 并测定解磷量; 用简并引物扩增 PSBHS 16S rDNA 基因一个长度约 1460 bp 的片段, 测序后, 通过 Blast 检索同源序列, 鉴定解磷细菌分类。【结果】共分离到 363 个代表性菌株, 通过 I 筛、II 筛、III 筛的代表性菌株分别是 126 个、45 个、14 个; 14 个 PSBHS 在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养液中经 6 d 培养, 解磷量达 201.0 ~ 623.3 mg/L, 培养结束时 pH 值 (3.82 ~ 4.34) 与解磷量呈极显著负相关 ($r = -0.8155$)。14 个 PSBHS 在 FePO_4 培养液中经 6 d 培养, 解磷量只有 1.6 ~ 34.2 mg/L, 培养结束时 pH 值 (2.87 ~ 5.67) 与解磷量也呈极显著负相关 ($r = -0.6836$)。16S rDNA 序列分析, 确定了 6 个 PSBHS 为 *Acinetobacter*, 3 个为 *Pseudomonas*, 3 个为 *Serratia*, 2 个为 *Enterobacter*。

关键词: 解磷细菌, 筛选, 分子鉴定, 根际土

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)01-0064-08

磷是植物生长发育的必需元素之一, 但土壤中 95% 以上的磷素与土壤中 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等金属离子结合而丧失植物有效性, 施入土壤中的可溶性磷肥也因为土壤的固定作用, 当季利用率只有 5% ~ 10%, 加上作物的后效, 利用率不超过 25%^[1]。研究表明, 土壤中存在大量的解磷微生物, 它们能将土壤中的难溶磷酸盐转化为植物可吸收利用的可溶形态。这些微生物主要的解磷机制是在代谢过程中产生有机酸, 通过降低土壤环境的 pH 值和通过有机酸阴离子的络合作用促进磷的释放。接种解磷微

生物提高土壤难溶性磷的植物有效性和磷肥利用率一直备受关注。由于不同种类解磷微生物的解磷能力和生态适应性方面有很大差异, 了解解磷微生物的解磷特性和其栖息地的地质特征尤为重要。以往的解磷微生物研究主要集中在石灰性土壤, 较少涉及酸性土壤。本项研究从海南的 28 个呈酸性的根际土样品筛选解磷细菌, 研究了它们溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 FePO_4 的特性, 并初步鉴定其分类, 为酸性土壤解磷细菌的应用研究提供菌源。

基金项目: 中国热带农业科学院基金 (Rky0502)

* 通信作者。Tel: +86-898-23301554; Fax: +86-898-23300315; E-mail: zhaorongtang@126.com

作者简介: 王岳坤 (1969-) 男, 广东普宁人, 助理研究员, 硕士, 从事土壤微生物生态学研究。Tel: +86-898-23301554; E-mail: xwangyk@126.com

收稿日期: 2008-07-04; 修回日期: 2008-09-13

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 采样地的植物类型:根际土采自海南 21 种植物,其中橡胶树 (*Hevea brasiliensis*)、桉树 (*Eucalyptus* sp.)、台湾相思树 (*Acacia* sp.)、毛竹 (*Phyllostachys* sp.)、香蕉 (*Musa* sp.)、茅草 (*Festuca* sp.)、结缕草 (*Zoysia tenuifolia*) 分布于海南儋州中国热带农业科学院试验农场,样地 0~20 cm 土层 pH 值 4.6~6.5。木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza*)、木果楝 (*Xylocarpus granatum*)、桐花木 (*Aegiceras cormiculatum*)、红树 (*Rhizophora apiculata*)、海漆 (*Excoecaria agallocha*)、角果木 (*Ceriops tagal*)、海莲 (*Bruguiera sexangula*)、尖瓣卤蕨 (*B. s. vae. rhynchopetala*)、老鼠勒 (*Acanthus ilicifolius*)、黄槿 (*Hibiscus tiliaceus*)、榄李 (*Lumnitzera racemosa*)、杯萼海桑 (*Sonneratia alba*)、白骨壤 (*Avicennia marina*)、大叶海桑 (*Sonneratia ovata*) 为红树林植物,分布于海南文昌清澜港红树林保护区,样地 0~20 cm 土层 pH 值 2.9~6.6^[21]。橡胶树采集 5 个根际土样品,桉树采集 4 个样品,其余 19 种植物各采集 1 个样品。

1.1.2 培养基:①细菌分离培养基:营养琼脂 (NA)^[3]、结晶紫-营养琼脂 (NAC)^[4]、酵母粉-甘露醇琼脂 (YEM)^[5]。所有培养基都添加土浸出汁 (20%) 和制霉菌素 (50 mg/L),pH 7.0。NA 是通用培养基;NAC 是在 NA 培养基中添加结晶紫 (1.0 mg/L),用于分离 G⁻ 菌;YEM 用于分离土壤杆菌。②细菌纯化培养基:最低营养琼脂 (NAM)^[5]。③测定解磷活性的培养基^[6]:葡萄糖 10 g,磷酸盐 5 g, MgCl₂·6H₂O 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, 去离子水 1.0 L, pH 7.0。所用的磷酸盐是 Ca₃(PO₄)₂ (含磷 19.97%) 或 FePO₄·4H₂O (含磷 13.89%), FePO₄·4H₂O 要求单独灭菌。

1.2 细菌分离和解磷活性测定

1.2.1 根际土样品的采集和制备过程:在野外用锄头挖出植物根,抖掉附着在根上的疏松土壤(红树林植物除外),取直径小于 2 mm 的小根,保存于封口塑料袋中,冰上放置不超过 24 h。在实验室用自来水浸泡植物小根 5 min,用镊子夹住这些小根轻轻来回晃动 3~5 次以洗去粘附在小根上的疏松土壤(非根际土);夹出小根,滴干水后,取 20 g 小根于研钵中研磨,将根表皮及土研磨成浆,用 50 mL 灭菌水冲洗研钵,将土悬液过两层纱布,收集滤液于三角瓶

中,差重法计算土(包括根表皮)的重量。加适量玻璃珠,室温下 200 r/min 振荡 0.5 h,静置 5 min 后,转出 2.0 mL 水土悬液至离心管中,加适量灭菌水,将土浆悬液稀释成 10⁻¹ 倍数,然后依次做 10 倍稀释,制备 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 土壤悬液。

在野外采集红树林植物幼根时,先用铁铲挖出 20~30 cm 深的土壤谱面,用剪刀剪断谱面上露出的植物根,用镊子夹取直径小于 3 mm 的小根(红树林须根较大),保存于封口塑料袋中,冰上放置不超过 24 h。在实验室直接用研钵研磨制备土及幼根匀浆的悬液。

1.2.2 细菌的分离、纯化及保藏:取 10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³ 稀释液 0.2 mL 涂布于分离细菌的 3 种固体培养基平板上 (NA、NAC、YEM),每梯度悬液涂 2 个平板,32℃ 培养 3 d。随机挑取平板上主要形态有明显区别的代表性菌落,划线到 NAM 平板上,再挑取单菌落,分别接种到 NAM 斜面上和 NA 液体培养基中培养 2~3 d,斜面培养物在 4℃ 保存,液体培养物加甘油(终浓度 20%)保藏于 -20℃。称这些菌株为代表性菌株。

1.3 菌株的筛选

用接种针从斜面上挑取代表性菌株,接种于 Ca-P 固体培养基平板上,每平板接种 3 个菌株,每菌株接种 3 个点,然后 32℃ 培养 5 d,记录菌落直径和周围透明圈的大小。有透明圈的菌落视为有解磷活性,称其相应的菌株为解磷细菌 (phosphate-solubilizing bacterial strain, PSB)。

将 I 筛得到的 PSB 进行液体培养:在 100 mL 三角瓶中装 20 mL Ca-P 培养液,用接种环将 PSB 从斜面接种至培养液中,每菌株接种 3 瓶,然后于 32℃、200 r/min 培养 6 d,8000 × g 离心 10 min,取上清液,用钼锑抗比色法测定无机磷含量^[7],用 pH 计测定培养液的 pH 值。PSB 的解磷量以培养液无机磷量与不接菌的培养液无机磷量的差值表示。以菌株解磷量 > 200 mg/L 为标准对菌株进行 II 筛。

将 II 筛得到的菌株进行继代培养,培养物在 4℃ 冰箱中保藏 15 d 后,再继代培养和培养物保藏;重复上述操作 4 次。再将 5 次继代的培养物接种至 Ca-P 培养液中,按 II 筛同样方法测定菌株的解磷量,并以相同的标准对菌株进行筛选。称 III 筛的选出菌株为高效稳定的解磷菌株 (Phosphate-solubilizing bacterial strains with high and stable activity, PSBHS)。

1.4 溶解磷酸铁特性

用相同的接种方法将 PSBHS 接种到 Fe-P 培养

液中,用相同的培养条件进行培养,并测定解磷量和培养液的 pH 值。

1.5 解磷活性的数据分析

解磷活性的数据用 Excel 2000 初步处理后,采用 SAS 6.12 统计软件及 Duncan's 全复矩法进行方差分析和多重比较。

1.6 菌属初步鉴定

按文献 [8] 提取 PSBHS 的基因组 DNA,用简并引物 (fD:5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCMTGGCTYAG-3', rP:5'-CCCGGGATCCAAGCTTACG GHTACCTTGTACGACTT-3',其中 M=A 或 C;Y=C 或 T;H=A 或 T 或 C) 扩增 16S rDNA 基因一个长度约 1460 bp 的基因片段,克隆、测序后,通过 Blast 检索公共序列数据库上的同源序列,根据最相似同源序列的菌株来源鉴定 PSBHS 的分类。

2 结果和分析

2.1 细菌分离和代表菌的选取

用 NA、NAC、YEM 3 种培养基分离 28 个根际土样品的细菌,获得 363 个代表性菌株。其中从 5 个橡胶树根际土样品获得 60 个代表性菌株,从 4 个桉树根际土样品中获得 46 个代表性菌株,从台湾相思树、香蕉、毛竹、茅草、结缕草的根际土样品中获得 47 个代表性菌株,从 14 种红树林植物的根际土样品获得 210 个代表性菌株。

2.2 筛选

将 363 个代表性菌株接种到 Ca-P 固体培养基上经 32℃ 培养 5 d,有 126 个菌株产生明显的溶磷圈(如图 1-A 中的 3 个菌株),135 个菌株虽能缓慢生长但无明显的溶磷圈(如图 1-B 中的 DR350 和 DR363),而其余菌株则不能生长。

用 Ca-P 培养液对具溶磷圈的 126 个 PSB 进行 32℃、200 r/min 培养 6 d,筛选出 45 个解磷量 > 200.0 mg/L(不接菌的对照培养液含磷 18.2 mg/L)的 PSB。

将 45 个 PSB 进行连续 4 次循环的继代培养——保藏过程,再将其斜面保存物接入 Ca-P 培养液中培养 6 d,发现有 31 个 PSB 解磷能力不稳定,在继代培养和 4℃ 保藏过程中逐渐丧失解磷能力,有 14 个 PSB 解磷量大于 200.0 mg/L(表 1),其中 DR379 菌株的解磷量最大,达 626.3 mg/L。

14 个 PSBHS 经 6 d 培养,Ca-P 培养液的 pH 值降至 3.82~4.34(对照液 pH 值 6.83)。培养液 pH 值(X)与菌株解磷量(Y)的相关系数 $r = -0.8155$,

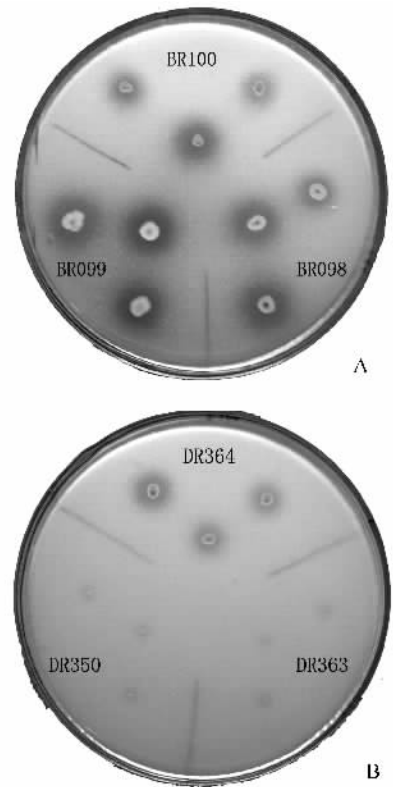


图 1 代表性菌株解磷活性的 Ca-P 固体平板测定

Fig. 1 Phosphate-solubilizing capability tests for bacterial representative strains were conducted on solid medium with tricalcium phosphate as the sole P source. Halo zones surrounding the colonies indicated corresponding strains with phosphate-solubilizing activities.

表 1 高效稳定解磷菌株经 6 d 培养对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的解磷量及培养后培养液的 pH 值^{a)}

Table 1 Amounts of phosphorus dissolved from $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by PSBHS after liquid cultivation for 6 days and the resulting pH values of media^{a)}

| Strain number of phosphate-solubilizing bacteria | Amount of dissolved phosphorus/(mg/L) | pH value of culture medium |
|--|---------------------------------------|----------------------------|
| DR379 | 626.3 ± 8.4 a | 3.82 ± 0.08 f |
| DR244 | 532.8 ± 44.0 b | 4.03 ± 0.06 e |
| BR098 | 428.2 ± 32.6 c | 4.05 ± 0.02 e |
| R115 | 374.1 ± 19.0 c | 4.01 ± 0.03 e |
| BR121 | 357.2 ± 73.1 cd | 4.16 ± 0.02 cd |
| AR045 | 356.1 ± 43.3 de | 4.03 ± 0.06 e |
| DR172 | 342.1 ± 18.5 de | 4.02 ± 0.04 e |
| BR119 | 314.0 ± 56.9 de | 4.10 ± 0.02 de |
| DR304 | 307.0 ± 32.7 de | 4.02 ± 0.05 e |
| AR066 | 292.1 ± 18.6 ef | 4.25 ± 0.07 abc |
| CR150 | 291.1 ± 11.1 fg | 4.22 ± 0.04 bc |
| BR126 | 288.2 ± 103.2 de | 4.34 ± 0.05 a |
| DR206 | 238.8 ± 21.7 fg | 4.26 ± 0.04 ab |
| CR142 | 201.0 ± 21.8 g | 4.29 ± 0.02 ab |
| Non-inoculated medium | 18.2 ± 3.4 ^{b)} | 6.83 ± 0.04 |

^{a)} Data are showed as mean ± Std., and the letters appended show the multiple comparison results for different means. Means with the same letter are not significantly different ($\alpha = 0.05$). ^{b)} Amount of dissolved phosphorus by non-inoculated medium.

$P < 0.01$, 达极显著水平。Y 与 X 的回归模型为 $Y = 1355.0 - 247.7X$ 。

2.3 溶解 FePO_4 特性

将 14 个 PSBHS 分别接入 Fe-P 培养液中, 进行 32°C 、200 r/min、6 d 培养, 发现这些菌株对 Fe-P 的解磷量都比较低, 解磷量 $> 19.0 \text{ mg/L}$ 的只有 4 个菌株 (BR098、BR115、BR119 和 DR379), 其中 DR379 的解磷量最大, 达 34.2 mg/L , 不接菌对照液含磷量 16.2 mg/L (表 2)。

表 2 高效稳定解磷菌株经 6 d 培养对 FePO_4 的解磷量及培养后培养液的 pH 值^{a)}

Table 2 Amounts of phosphorus dissolved from FePO_4 by PSBHS after liquid cultivation for 6 days and the resulting pH values of media^{a)}

| Strain number of phosphate-solubilizing bacteria | Amount of dissolved phosphorus (mg/L) | pH value of medium |
|--|---------------------------------------|----------------------------|
| DR379 | $34.2 \pm 5.4 \text{ a}$ | $2.87 \pm 0.06 \text{ i}$ |
| BR098 | $32.1 \pm 1.3 \text{ ab}$ | $3.05 \pm 0.09 \text{ gh}$ |
| BR119 | $29.1 \pm 1.0 \text{ b}$ | $3.02 \pm 0.08 \text{ h}$ |
| BR115 | $19.6 \pm 3.9 \text{ c}$ | $2.81 \pm 0.08 \text{ i}$ |
| BR121 | $6.6 \pm 1.1 \text{ d}$ | $3.13 \pm 0.08 \text{ gh}$ |
| DR244 | $6.2 \pm 1.0 \text{ d}$ | $3.15 \pm 0.05 \text{ g}$ |
| DR172 | $4.6 \pm 0.8 \text{ de}$ | $3.55 \pm 0.05 \text{ f}$ |
| CR150 | $3.0 \pm 0.7 \text{ ef}$ | $4.83 \pm 0.12 \text{ c}$ |
| DR304 | $2.6 \pm 0.7 \text{ ef}$ | $4.44 \pm 0.04 \text{ d}$ |
| AR066 | $2.6 \pm 0.3 \text{ ef}$ | $4.00 \pm 0.06 \text{ e}$ |
| CR142 | $1.9 \pm 0.9 \text{ f}$ | $3.94 \pm 0.05 \text{ e}$ |
| BR126 | $1.7 \pm 0.6 \text{ f}$ | $5.67 \pm 0.04 \text{ a}$ |
| AR045 | $1.6 \pm 0.5 \text{ f}$ | $5.64 \pm 0.04 \text{ a}$ |
| DR206 | $1.6 \pm 0.7 \text{ f}$ | $5.50 \pm 0.09 \text{ b}$ |
| Non-inoculated medium | $20.2 \pm 3.1 \text{ b}^{\text{b)}$ | 5.82 ± 0.04 |

a) and b), see Table 1 for annotations.

14 个 PSBHS 经 6 d 培养, Fe-P 培养液的 pH 值降至 $2.81 \sim 5.67$ (对照液 pH 值 5.82)。培养液 pH 值 (X) 与菌株解磷量 (Y) 的相关系数 $r = -0.6836$, $P < 0.01$, 达极显著水平。Y 与 X 的回归模型为 $Y = 42.1640 - 7.9658X$ 。其中 4 个解磷量在 $19.0 \sim 34.2 \text{ mg/L}$ 的菌株, 培养液 pH 值降至 $2.81 \sim 3.05$ 。结果表明, 解磷活性较强的菌株对培养液的酸化作用比较明显。

2.4 菌属分子鉴定

细菌的 16S rDNA 基因序列长度约 1540 bp, 具有高度的保守性, 被比拟为细菌进化的分子计时器, 它是细菌系统分类的一个重要指标。根据细菌的 16S rDNA 基因序列, 一般可以鉴定细菌至属的分类地位。我们随机选取公共序列数据库中 50 个细菌属不同种菌株的 16S rDNA 序列, 比对分析后发现,

同属不同种的 16S rDNA 序列在比对区段内 ($\geq 1450 \text{ bp}$) 的不匹配碱基总数一般不超过 4 个。因此, 16S rDNA 序列比对区段 $\geq 1450 \text{ bp}$ 和不匹配碱基总数 ≤ 4 个可作为鉴定两个菌株为相同属类的标准。

我们用简并引物扩增解磷细菌的 16S rDNA 基因一个长度约 1460 bp 的片段 (去除引物序列), 克隆测序后, 用 Blast 工具搜索公共数据库中的同源序列, 得到表 3 的搜索信息。可以看出, 同源性最高的公共数据库序列 (对应菌株已鉴定至属或种) 与克隆序列在比对区段内 ($\geq 1450 \text{ bp}$) 的不匹配碱基总数不超过 4 个。因此, 我们认为解磷细菌归类于同源最高的公共数据库序列所对应的细菌属。

从表 3、表 4 看出, 14 个解磷细菌有 6 个属于 *Acinetobacter*, 3 个属于 *Pseudomonas*, 3 个属于 *Serratia*, 2 个属于 *Enterobacter*。已有文献 [9, 10] 报道了 *Pseudomonas*、*Serratia*、*Enterobacter* 中的一些种, 具有溶解难溶性磷酸盐的特性, 李黎等 [11] 报道分离到溶解有机磷的 *Acinetobacter* 菌株, 但未有文献报道 *Acinetobacter* 溶解难溶性磷酸盐。

3 讨论

土壤中无机磷主要有原生矿物和次生矿物两类。原生矿物有 200 多种, 次生矿物主要是沉淀态的磷酸盐。次生矿物可以分为闭蓄态磷和非闭蓄态磷两种类型, 闭蓄态磷指磷酸铁和磷酸铝被氧化铁形成的酸膜包蔽, 活性低, 向土壤供磷能力弱; 非闭蓄态磷包括磷酸铁、磷酸铝和磷酸三钙 3 种形态, 在一定条件下磷可以逐渐释放出来。酸性土壤和石灰性土壤次生矿物的种类及相对含量差别很大, 在我国北方的石灰性土壤中, 非闭蓄态磷的磷酸钙占无机磷量的 $60\% \sim 80\%$, 磷的铁和铝盐极少; 在南方的砖红壤中, 闭蓄态的磷酸盐占无机磷量的 80% , 而非闭蓄态磷以磷酸铁为主, 磷酸铝和磷酸钙盐很少 [10]。

磷酸三钙和磷酸铁的溶度积分别为 10^{-29} 、 1.3×10^{-22} , 当固相和液相达平衡状态时, 磷酸三钙溶液和磷酸铁溶液中的磷酸根离子活度分别约 10^{-7} mol/L 、 10^{-11} mol/L , 因此, 酸性土壤由于非闭蓄态磷主要是磷酸铁, 其磷的利用难度明显比石灰性土壤 (非闭蓄态磷主要是磷酸三钙) 大, 所以两类土壤的解磷微生物菌群有很大差异。

我们另有实验证明, 在 1 L 去离子水中分别加 5 g 磷酸三钙和 5 g 磷酸铁, 放置 6 d 后, 两种溶液的 pH 值为 6.86、3.54, 无机磷含量为 13.8 mg/L 、

6.4 mg/L,如果在配制磷酸三钙溶液时加入2 mol/L 盐酸 2.7 mL,在配制磷酸铁溶液时加入2 mol/L氢氧化钠 2.0 mL,放置 6 d 后,两种溶液的 pH 分别为

5.46、5.96,无机磷含量分别为70.6 mg/L、14.2 mg/L。由此可见,降低溶液的 pH 值,可以提高磷酸三钙的溶解度,但减少磷酸铁的溶解度。

表 3 解磷细菌 16S rDNA 序列的 Blastn 检索结果^{a)}

Table 3 Blastn search results for the 16S rDNAs of different phosphate-solubilizing bacteria^{a)}

| Information on submitted sequences | | | Sequences producing significant alignments | | | | Information on alignments | | |
|------------------------------------|---------------------|------------------------------|--|---------------------|----------------------|---------------------------------|---------------------------|------------------|-------------|
| Strain No. | Sequence length/ bp | Accession No. | Microorganism species | Sequence length/ bp | Alignment domain/ bp | Accession No. | Score | Identities | Gaps |
| DR379 | 1465 | gb EU603505 | <i>Serratia marcescens</i> | 1464 | 1-1464 | dbj AB244453.1 | 2864 | 1461/1465 (99%) | 1/1465 (0%) |
| | | | <i>Serratia marcescens</i> | 1464 | 1-1464 | dbj AB244433.1 | 2864 | 1461/1465 (99%) | 1/1465 (0%) |
| AR045 | 1460 | gb EU603506 | <i>Acinetobacter</i> sp. | 1465 | 13-1465 | gb AY273199.1 | 2880 | 1453/1453 (100%) | 0/1453 (0%) |
| | | | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 1557 | 47-1506 | gb EF432578.1 | 2807 | 1449/1460 (99%) | 0/1460 (0%) |
| BR098 | 1464 | gb EU603508 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1506 | 24-1487 | gb DQ439976.1 | 2886 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1506 | 24-1487 | dbj AB091837.2 | 2886 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| BR115 | 1464 | gb EU603509 | <i>Serratia marcescens</i> | 1533 | 20-1483 | gb EF208030.1 | 2886 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Serratia marcescens</i> | 1533 | 20-1483 | gb EF194094.1 | 2886 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| BR119 | 1464 | gb EU603510 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1506 | 24-1487 | gb DQ439976.1 | 2894 | 1463/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1506 | 24-1487 | dbj AB091837.2 | 2894 | 1463/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| BR121 | 1464 | gb EU603511 | <i>Serratia marcescens</i> | 1534 | 21-1484 | gb EU233275.1 | 2894 | 1463/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Serratia</i> sp. | 1484 | 11-1475 | emb AJ846269.1 | 2872 | 1462/1465 (99%) | 1/1465 (0%) |
| CR142 | 1459 | gb EU603513 | <i>Acinetobacter baumannii</i> | 1480 | 1-1459 | gb AY738399.2 | 2892 | 1459/1459 (100%) | 0/1459 (0%) |
| | | | <i>Acinetobacter</i> sp. | 1501 | 21-1479 | gb EF494199.1 | 2876 | 1457/1459 (99%) | 0/1459 (0%) |
| DR172 | 1464 | gb EU603515 | <i>Enterobacter</i> sp. | 1537 | 24-1487 | dbj AB114268.1 | 2894 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Enterobacter cloacae</i> | 1463 | 1-1463 | dbj AB244457.1 | 2870 | 1461/1464 (99%) | 1/1464 (0%) |
| DR244 | 1464 | gb EU603517 | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1506 | 24-1487 | gb DQ439976.1 | 2886 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Pseudomonas fluorescens</i> | 1506 | 24-1487 | dbj AB091837.2 | 2886 | 1462/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |
| DR304 | 1464 | gb EU603518 | <i>Enterobacter hormaechei</i> | 1539 | 39-1502 | gb AY995561.1 | 2902 | 1464/1464 (100%) | 0/1464 (0%) |
| | | | <i>Enterobacter hormaechei</i> | 1514 | 1-1464 | emb AJ853890.1 | 2874 | 1460/1464 (99%) | 0/1464 (0%) |

^{a)} This table does not show the Blastn results for the 16S rDNA of AR066 ([gb|EU603507|](#)), BR126 ([gb|EU603512|](#)), CR150 ([gb|EU603514|](#)) and DR206 ([gb|EU603516|](#)), because the 16S rDNA of AR066, BR126 and DR206 share 100% identity to that of AR045, and CR150 showing 100% identity to CR142.

表4 解磷细菌可能的分类单元(属)和根际土采集地点的植物类型

Table 4 Possible Genus of the phosphate-solubilizing bacteria and the plant species for the corresponding rhizosphere sampling

| Strain No. | Possible Genus of phosphate-solubilizing bacteria | Species of plant growing on sampling sites |
|------------|---|--|
| AR045 | <i>Acinobacter</i> sp. | <i>Hevea brasiliensis</i> |
| AR066 | <i>Acinobacter</i> sp. | <i>Musa</i> sp. |
| BR098 | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Eucalyptus</i> sp. |
| BR115 | <i>Serratia</i> sp. | <i>Eucalyptus</i> sp. |
| BR119 | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Eucalyptus</i> sp. |
| BR121 | <i>Serratia</i> sp. | <i>Eucalyptus</i> sp. |
| BR126 | <i>Acinobacter</i> sp. | <i>Phyllostachys</i> sp. |
| CR142 | <i>Acinobacter</i> sp. | <i>Festuca</i> sp. |
| CR150 | <i>Acinobacter</i> sp. | <i>Festuca</i> sp. |
| DR172 | <i>Enterobacter</i> sp. | <i>Hibiscus tiliscus</i> |
| DR206 | <i>Acinobacter</i> sp. | <i>Hibiscus tiliscus</i> |
| DR244 | <i>Pseudomonas</i> sp. | <i>Acanthus ilicifolius</i> |
| DR304 | <i>Enterobacter</i> sp. | <i>B. s. vae. rhynchopetala</i> |
| DR379 | <i>Serratia</i> sp. | <i>Rhizophora apiculata</i> |

由于微生物溶解难溶态磷的主要机制是分泌有机酸,这些有机酸在石灰性土壤中无论通过降低土壤 pH 值还是通过有机酸阴离子的络合作用都可促进磷酸三钙的溶解;在酸性土壤中,有机酸对非闭蓄态磷酸铁的溶解有两种作用:①有机酸降低土壤 pH 值减少磷的释放,②有机酸阴离子的络合作用增加磷的释放。如果有机酸溶解了非闭蓄态磷酸铁,其阴离子对铁离子的络合作用必须占主导地位。因此,解磷微生物分泌的有机酸种类是其能否利用非闭蓄态磷酸铁的关键。大量的研究表明,土壤中的解磷微生物,多数能溶解磷酸三钙,只有少数能溶解磷酸铁和磷酸铝^[12]。本文筛选的 14 个菌株的解磷特性,也证实这个结论。

比较 DR379、BR098、BR119、BR115 这 4 个菌株对 Ca-P 和 Fe-P 的解磷量和它们在培养过程中使 Ca-P 培养液和 Fe-P 培养液 pH 值下降的幅度,我们发现,这些菌株利用 Fe-P 的难度明显比利用 Ca-P 大。如果溶液中同时存在 Ca-P 和 Fe-P,并且培养液初始 pH 值为 7.0,那么解磷细菌会优先利用 Ca-P,因为当培养液 pH 下降至大约 4.0 时,它们对 Ca-P 的解磷量已经超过 200.0 mg/L,而它们在该酸度条件下,对 Fe-P 的解磷量低于 34.0 mg/L。

本文发现解磷细菌的解磷量与培养液的 pH 值存在显著负相关关系,与赵小蓉等^[13]的研究结果基本相同,但与 Thomas^[14]、Asea 等^[15]、Varsha 等^[16]的研究结果相悖。主要原因是:①不同解磷菌其解磷机制可能不同,②不同解磷菌分泌的有机酸种类及总

量差异很大,而不同类型的难溶性磷酸盐对这些有机酸的释磷作用敏感性不相同。

国内有不少文献指出,向土壤或作物根系接种解磷菌,能够促进小麦、青菜、玉米、苜蓿、甘蓝、青菜、花生、油菜、柱花草的产量^[17-22],但是这些文献由于缺乏以下的研究结果其严谨性和说服力并不太高:①接入土壤的解磷菌在土壤中是否大量繁殖,并在一定时期内形成土壤解磷微生物的优势种群;②接入土壤的解磷菌利用了土壤中哪种形态的磷,是否使土壤有效磷含量比对照处理有明显的提高。

目前尚没有向多年生作物接种解磷微生物的研究报道。主要原因是:①目前解磷微生物在短期作物的应用研究还处在探索阶段,不能为多年生作物接种解磷微生物的研究提供很好的借鉴;②多年生作物植株高大,抗逆性强,某一时期的逆境条件不会快速反映到其长势上;③多年生作物与解磷微生物的生命周期差别太大,在没有掌握解磷微生物在土壤中的繁殖规律之前,仅靠一两次局部的根系接种(解磷微生物)一般不可能获得土壤有效磷含量和植物长势差异的效果。

橡胶树、桉树都是多年生林木,两者在海南的种植面积分别达到 39 万 km²、20 万 km²,是海南两种最重要的经济林木^[23]。这两种林木主要种植于低山丘陵地带,土壤类型主要是砖红壤、燥红土,土壤呈酸性。由于长期使用化学肥料,这些地区的土壤退化问题已相当严重。本文所筛选的解磷微生物,将在这两种林木上接种进行繁殖规律研究。

红树林是热带、亚热带海岸潮间带的植物群落,由于地处陆海交界处,微生物资源非常丰富。本文从红树林根际土中分离解磷细菌,主要目的是为橡胶树和桉树的接种试验提供菌源。

参考文献

- [1] 王光华,周可琴,金剑,等. 不同氮源对 3 种溶磷真菌溶磷矿粉能力的影响. 农业系统科学与综合研究 (System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture), 2003, 19(4): 260-263.
- [2] 王岳坤,洪葵. 红树林土壤因子对土壤微生物数量的影响作用. 热带作物学报 (Chinese Journal of Tropical Crops) 2005, 26(3): 109-114.
- [3] 方中达. 植病研究方法. 第三版. 北京:中国农业出版社, 1998: 182.
- [4] 诸葛健,王正祥. 工业微生物实验技术手册. 第一版. 北京:中国轻工业出版社, 1994: 342-345.

- [5] C. Shekhar Nautiyal. Rhizosphere competence of *Pseudomonas* sp. NBR19926 and *Rhizobium* sp. NBR19513 involved in the suppression of chickpea (*Cicer arietinum* L.) pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Ecology*, 1997, 23 :145 - 158.
- [6] C. Shekhar Nautiyal: An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170 :265 - 270.
- [7] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法. 第一版. 北京: 中国农业科技出版社, 2000 :180 - 181.
- [8] Ausubel F, Brent R, Kingston RE, et al. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 第一版. 北京: 科学出版社, 1998 :39 - 40.
- [9] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料 (*Soil and Fertilizer*) 2001, 3 :7 - 11.
- [10] 唐勇, 陆玲, 杨启银, 等. 解磷微生物及其应用的研究进展. 天津农业科学 (*Tianjin Agricultural Sciences*), 2001, 7(2) :1 - 5.
- [11] 李繁, 涂然, 陈三凤. 7 株解有机磷细菌的分离和鉴定. 农业生物技术学报 (*Journal of Agricultural Biotechnology*) 2006, 14(4) :600 - 605.
- [12] 周克琴, 王光华, 金剑, 等. 土壤微生物对提高植物磷素营养的作用. 农业系统科学与综合研究 (*System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*) 2003, 19(3) :232 - 236.
- [13] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 微生物溶解磷矿粉能力与 pH 及分泌有机酸的关系. 微生物学杂志 (*Journal of Microbiology*) 2003, 23(3) :5 - 7.
- [14] Thomas GV. Occurrence and ability of phosphate-solubilizing fungi from coconut plant soils. *Plant and Soil*, 1985, 87 :357 - 364.
- [15] Asea PEA, Kucey RMN, Stewart JWB. Inorganic phosphate solubilization by two *Penicillium* sp. in solution culture and soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 1988, 20 :459 - 464.
- [16] Varsha N, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biology Biochemistry*, 2000, 32 :559 - 565.
- [17] 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. 土壤通报 (*Chinese Journal of Soil Science*) 2002, 33(1) :44 - 46.
- [18] 曾广勤, 刘荣昌, 张爱民, 等. 磷细菌剂在小麦上的应用研究. 河北省科学院学报 (*Journal of Hebei Academy*), 1997, 3 :25 - 28.
- [19] 尹瑞岭, 许月蓉, 顾希贤. 解磷接种物对垃圾堆肥中难溶性磷酸盐的转化及在农业上的应用. 应用与环境生物学报 (*Chinese Journal of Applied Environmental Microbiology*) 1995, 1(4) :371 - 378.
- [20] 邵春华, 张强, 卢朝东, 等. 选用解磷菌剂改善缺磷土壤磷素的有效性. 农业工程学报 (*Transactions of the CSAE*) 2005, 21(5) :56 - 59.
- [21] 范丙全, 金继运, 葛诚. 溶磷真菌促进磷素吸收和作物生长的作用研究. 植物营养与肥料学报 (*Plant Nutrition and Fertilizer Science*) 2004, 10(6) :620 - 624.
- [22] 覃丽金, 王真辉, 陈秋波, 等. 解磷细菌接种对热研 2 号柱花草生长与土壤酸化的效应. 草业学报 (*Acta Pratacultuae Sinica*) 2008, 17(1) :20 - 28.
- [23] 海南省人民政府. 海南年鉴. 第一版. 海南: 海南年鉴社出版, 2006 :135.

Screening and molecular identification of phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere soils in Hainan ecosystem

Yuekun Wang, Fei Yu, Chaorong Tang*

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract [Objective] To know the activities of dissolving $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and FePO_4 of phosphate-solubilizing bacteria (PSB) isolated from acidic soil in Hainan province in China and to screen PSB with high and stable activity (PSBHS). **[Methods]** Soil samples of 21 plant species were isolated with nutrient agar, crystal violet-nutrient agar, and yeast extract-mantol agar with dilution-plate method. Bacterial representative of the predominant morphologically distinct colonies present on plates were selected randomly and purified on minimal nutrient agar. First screening was done on solid medium with tricalcium phosphate (Ca-P) as the sole P source, and after 5 days of cultivation the colonies with phosphate-solubilizing zones were selected for further screening. Secondary screening was conducted by cultivating the selected colonies in Ca-P liquid medium for 6 days at 32°C with shaking of 200 r/min, and PSB capable of solubilizing phosphorus up to more than 200 mg/L were selected. The third screening—

6-day shaking cultivation in Ca-P liquid media—was conducted after 4 successive cycles of transfer-culture plus 15 d-storage at 4°C. PSB capable of solubilizing phosphorus up to more than 200 mg/L was selected and termed as PSB_{HS}. Then PSBHS were cultivated in FePO₄ liquid media for 6 days ,and the activity of dissolved phosphorus was determined. The 16S rDNA gene sequencing and blast search against the public database were used to identified PSBHS. [**Results**] In total 363 bacterial representatives were isolated from soil samples ,and the following three screenings reduced the number of representatives to 126 , 45 ,and 14 respectively. The amounts of dissolved phosphorus by 14 PSBHS after 6 days of cultivation in Ca-P liquid media were up to 201.0 mg/L ~ 623.3 mg/L ,the pH values of media decreased to 3.82 ~ 4.34 from initial 7.0 ,and the final pH values were found to be significantly negatively correlated to the amounts of dissolved phosphorus. After 6-day of cultivation in FePO₄ liquid media ,only a small amount of phosphorus(1.6 mg/L ~ 34.2 mg/L) were solubilized by PSBHS ,and the final pH values of media decreased to 2.87 ~ 5.67—also significantly negatively correlated to the amounts of dissolved phosphorus. The 16S rDNA gene sequencing analysis identified 6 PSBHS to be *Acinetobacter* 3 to be *Pseudomonas* 3 to be *Serratia* 2 to be *Enterobacter*.

Keywords : phosphate-solubilizing bacterial strains (PSB) ; screening ; molecular identification ; rhizosphere soils

(本文责编 张晓丽)

Supported by the Chinese Academy of Tropical Agricultural Science (Rky 0502)

* Corresponding author. Tel : + 86-898-23301554 ; Fax : + 86-898-23300315 ; E-mail : chaorongtang@126. com

Received 4 July 2008/ Revised 13 September 2008

本刊荣获‘ 2008 年度中国精品科技期刊 ’称号



2008 年 12 月 9 日中国科学技术信息研究所在北京国际会议中心召开的‘ 中国科技论文统计结果发布会 ’上《微生物学报》被评为 2008 年度中国精品科技期刊。

据中国科学技术信息研究所 2008 年 11 月公布的统计结果 ,我国大陆的科技期刊已达 6082 种、中国科技核心期刊 1765 种 ,此次“ 精品科技期刊服务与保障系统项目组 ”评选出 323 种精品科技期刊。

《微生物学报》能够获得此项殊荣 ,是广大作者、专家共同努力的结果 ,在此衷心地感谢你们 !