

DOI: 10.5846/stxb201406171262

赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 李源, 厉静杰, 吕佳萌, 朱自亿, 秦珊珊, 贺学礼. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生. 生态学报, 2015, 35(13): 4425-4435.

Zhao L F, Xu Y J, Cao D J, Li Y, Li J J, Lü J M, Zhu Z Y, Qin S S, He X L. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(13): 4425-4435.

溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生

赵龙飞^{1,*}, 徐亚军¹, 曹冬建¹, 李 源¹, 厉静杰¹, 吕佳萌¹, 朱自亿¹, 秦珊珊¹, 贺学礼²

¹ 商丘师范学院生命科学学院, 河南省高校植物与微生物互作重点实验室, 商丘 476000

² 河北大学生命科学学院, 保定 071002

摘要: 对采自河南省不同地区的大豆根瘤进行内生菌分离纯化、溶磷性筛选试验。根据能否产生溶磷圈及溶磷圈直径(D)、菌落直径(d)和 D/d 值大小确定菌株溶磷能力, 采用钼锑抗比色法测定培养液中有有效磷含量; 平板筛选法对筛选菌株进行耐盐性、耐酸碱、重金属等抗性测定, 并对筛选菌株进行理化特性、16S rDNA、*recA* 序列和系统发育分析。结果表明, 从分离纯化的 324 株内生菌中筛选出 36 株具有溶磷特性, 其中 20 株有较强溶磷性。菌株 DD291 发酵液中可溶性磷含量最高(452 mg/L), 发酵液 pH 与对照相比均有不同程度下降, 最大降幅达 2.92。大部分溶磷性内生菌具有较强耐盐碱性, 对 Pb^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Cu^{2+} 有较高耐受性, 对 Ni^{2+} 和 Hg^{2+} 抗性较弱。结合细胞形态、生理生化、16S rDNA、*recA* 序列和系统发育分析结果, 菌株确定为 *Bacillus cereus*, *Enterobacter cancerogenus*, *E. cloacae* 和 *Pseudomonas putida*。部分溶磷菌株对大豆的生长有促进作用, 显示出潜在的应用前景。

关键词: 大豆; 根瘤内生菌; 溶磷性; 筛选; 抗性; 系统发育分析

Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules

ZHAO Longfei^{1,*}, XU Yajun¹, CAO Dongjian¹, LI Yuan¹, LI Jingjie¹, LÜ Jiameng¹, ZHU Ziyi¹, QIN Shanshan¹, HE Xueli²

¹ Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions of Henan, College of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China

² College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China

Abstract: Endophytes were isolated from soybean nodules collected from different regions of Henan province, and phosphorus dissolving experiments were performed on the purified strains. The ability of strains to dissolve phosphorus were primarily determined based on whether it can produce dissolved phosphorus halo, the diameter of the dissolved phosphorus halo (D), the diameter of the colonies (d) and D/d value. The phosphate-solubilizing capacity of endophytes was assayed by molybdenum-antimony-D-iso-asorbic-acid-colorimetry (MADAC) in inorganic phosphorus liquid culture. Resistances of the tested strains to such factors as salt, pH and heavy metals were measured through adopting plate screening method. Physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA and *recA* sequencing, phylogenetic analysis and inoculation tests

基金项目: 国家自然科学基金(U1204301, 31170488); 河南省教育厅科学技术研究重点项目(12A210019); 河南省高等学校青年骨干教师资助项目(2012GGJS166)

收稿日期: 2014-06-17; **网络出版日期:** 2015-01-27

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: hnzhaozlongfei@163.com

were determined for the strains. Results showed that 36 strains of the 324 isolated endophytes were able to dissolve phosphorus and 20 strains with stronger phosphate-solubilizing capacity ($D/d = 1.218—3.55$) were selected for further studies. Phosphate-solubilizing capacity of strain DD291 during plate screening was maximum ($D/d = 3.55$). Soluble phosphorus content in fermented liquid increased 1—11.9 times compared with that of the control, and among them, such value of DD291 was the highest (452 mg/L), followed by that of DD284. However, all strains had different degree of pH decline compared with that of the control, and the biggest drop amounted to up to 2.92 units. Soluble phosphorus content increased, which held certain relevance to lower pH, but soluble phosphorus contents of strains with approximately close pH values were different. Most of the phosphorus dissolving endophytes had strong saline-alkaline tolerances. Some strains can tolerance and grow on plate containing maximum 8% salt concentration. Under the pH 11, strains DD283 and DD284 never grew, but DD291 grew well and its growth status was second only to that of control, and the rest 4 isolates (DD028, DD140, DD167 and DD186) survived. However, strains can grow under pH 7, second only to control. In the setting range of heavy metal concentration, only isolate DD283 of seven strains can tolerate five kinds of heavy metal simultaneously, whereas the remaining six strains can tolerate four different concentrations of heavy metals. In a whole, seven strains showed higher tolerances to heavy metal ions Pb^{2+} , Cr^{6+} and Cu^{2+} under the tested concentrations, while their tolerances to Ni^{2+} and Hg^{2+} were lower. Judged together by their cellular morphological characteristics, physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA and *recA* sequencing results and phylogenetic analysis, these strains were identified as *Bacillus cereus*, *Enterobacter cancerogenus*, *E. cloacae* and *Pseudomonas putida*, respectively. Results of inoculation showed that shoot height and fresh weight of seedlings inoculated respectively endophytes and *Rhizobium* increased compared with those of controls. For *Sinorhizobium fredii* USDA205^T, DD284, DD186 and DD167, seedling height significantly increased by 35.43%, 35.43%, 27.06% and 29.86%, respectively. Fresh weight of seedling inoculated with *S. fredii* USDA205^T increased to the maximum extent (104%), DD167 (58.46%) to the second. However, seedlings inoculated alone with soluble phosphorus endophytes did not nodule. Screening excellent strains with phosphorus-solubilizing ability, salinity tolerance and metal resistance from microenvironment, analyzing their phylogenetic positions and investigating their growth promotion effects on host soybean plants provide potential application prospects for the regulation and enhancement of host plants' growth environments, which are beneficial for soybean growth.

Key Words: soybean (*Glycine max*); phosphorus dissolving characteristics; root nodules endophytes; screening; resistance; phylogenetic analysis

磷元素是植物生长发育过程中不可缺少的三大元素之一,土壤中磷素缺乏是限制农业生产的重要因素。我国有 74% 的耕地土壤缺磷,土壤中 95% 以上磷为无效磷,施入的磷肥当季利用率仅为 5%—25%,植物吸收的磷仅有两种可溶性离子形式,即 $H_2PO_4^-$ 和 HPO_4^{2-} 。大部分磷与土壤 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 结合形成难溶性磷酸盐^[1]。土壤中具有不同解磷能力的微生物,可依靠自身代谢产物或生物协同作用溶解土壤中难溶性无机磷,提高土壤磷利用率,在磷素转化中起着重要作用^[2]。近年来研究^[3-5]表明,植物根际、磷矿区以及特殊生境中许多溶磷性微生物,也可把磷转化为可吸收状态,开发利用溶磷微生物这一巨大资源宝库,对减少土壤板结,增强作物抗病力^[6],修复盐碱地、重金属污染及保持生态环境有重要作用。因此,从土壤及植物根际筛选高效溶磷微生物,研究其溶磷活力是目前研究的热点。

植物内生菌是植物微生态系统的重要组成部分^[7],大多数内生细菌是兼性内生^[5],可减缓受土著微生物的影响、解决定殖难等问题。关于内生菌溶磷问题已有许多报道,如王辰月等^[8]从线叶蒿草中分离出枯草芽孢杆菌 LXA1,对无机磷溶解能力为 28.14 mg/L;冯利利^[9]从柠条根系内分离到 4 株解磷内生细菌并测定其解磷能力;郑燕玲等^[10]用溶磷圈法从石斛兰中筛选出解磷菌,发现 10 株细菌及 2 株真菌具解磷能力;黄静等^[5]从油菜和玉米植株中筛选出溶磷性内生菌并研究其遗传多样性,结果表明所有菌株都能从磷酸钙中释放出有

效磷;张国霞等^[11]从普通野生稻中分离 36 株内生菌并测定其溶磷特性,结果表明 21 株菌溶磷能力差异较大;蒋国彪^[12]从小麦中筛选出溶磷内生菌 JG-22 对磷酸钙培养基中磷的溶解能力最强。这些研究均已证实从草本、灌木以及作物内可分离筛选出相应溶磷菌株,对缓解宿主植物磷素缺乏提供了宝贵资源。虽然已有对豆科作物特殊生境——大豆根瘤内容磷性内生菌资源和功能做了研究^[13-14],但由于地域和大豆品种的局限性,加之,到目前为止,还未见对河南省不同地区大豆根瘤内生菌进行过研究,鉴于此,本文拟分离、筛选、鉴定河南省不同地区的大豆根瘤内生菌株,以期发现具有溶磷、抗性和促生的菌株,为根瘤溶磷性内生菌资源的开发和利用提供资源和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

采集河南省不同地区的大豆根瘤,用无菌水清洗后,经无水乙醇处理 20—30 s,3% NaClO 处理 3—5 min,再用无菌水洗涤 5—8 次,并以最后一次洗涤的水作为对照,以此验证根瘤表面消毒是否彻底。用无菌镊子压迫根瘤,在牛肉膏蛋白胨培养基上划线接种,培养 4—7 d,把形成的单菌落再经划线分离,经镜检获得纯菌株,把单菌落接种到固体斜面培养基上,28 ℃ 培养 3—5 d,短期 4 ℃ 低温保藏备用,共获得 324 株菌。

1.2 培养基

YMA(Yeast Mannitol Agar)培养基^[15]、牛肉膏蛋白胨培养基^[16]、无机磷液体培养基(National Botanical Research Institute's phosphate growth medium, NBRIP)^[11]、无机磷固体培养基(Pikovaskaia's, PKO)^[5]。

1.3 溶磷性测定

1.3.1 菌悬液制备

用 YM 液体培养基(YMA 培养基不加琼脂)培养 24 h 收集菌体。将菌悬液倒入 2 mL 离心管中,8000 r/min 离心 10 min,用无菌水清洗菌体后再向沉淀中加入无菌水,涡旋振荡制成菌悬液,调节 OD 值为 0.8 (约 10^8 CFU/mL)以备用。

1.3.2 溶磷性大豆根瘤内生菌初筛

采用多点接种法,吸取 100 mL 菌悬液加入多点接菌器槽内,接种至预先制备的无机磷培养基平板上,每个平板接种 5 个不同菌样,28 ℃ 下培养 4—7 d,观察有无溶磷圈形成,测定溶磷圈直径(D)、菌落直径(d),根据能否产生溶磷圈和 D/d 值大小来判断菌株有无溶磷能力及溶磷能力大小^[17]。

1.3.3 溶磷性大豆根瘤内生菌复筛

经初筛获溶磷能力较强的菌株,复筛方法同初筛,与初筛的区别是在一个平板内点接同种菌样,每个处理 3 次重复。置于 28 ℃ 恒温培养 4—7 d,观察并测定透明圈和菌落直径大小。

1.3.4 液体培养基中内生菌的溶磷效果

在盛有无菌 NBRIP 液体培养基的三角瓶中按 2% 接菌量接入菌悬液,每株 3 个重复,不接菌的 NBRIP 液体培养基为对照。置于 28 ℃、150 r/min 震荡培养 7 d 后,将菌液经 8000 r/min 4 ℃ 冷冻离心 15 min,取上清液 1 mL 于 100 mL 容量瓶中,采用钼锑抗比色法测定培养液中有效磷含量^[5];同时取 5 mL 离心后上清液用 pH 计测定培养液 pH 值。

1.4 筛选菌株抗性测定

1.4.1 菌株耐盐能力测定

分别配制含 NaCl 浓度 4%、5%、6%、7%、8%、9% 的 YMA 固体培养基,将筛选菌株接种在不同浓度 NaCl 的 YMA 培养基上,其中浓度为 0.01% 的 YMA 培养基为对照,每一个处理 3 次重复。在 28 ℃ 下培养 3—5 d 观察生长情况,生长记为“+”,不生长记为“-”。长势的好坏用“+”多少表示。

1.4.2 耐酸碱能力测定

设置 pH 值分别为 5、6、7、8、9、10、11 的 YMA 培养基,以 pH 值 7 的基础培养基为对照,每个处理 3 次重

复。用 1 mol/L 的 NaOH 或 HCl 将 YMA 培养基调至设定 pH 值,高温灭菌后再次调节 pH 值至设定值,而后制成平板。将筛选菌株接种在不同 pH 值的 YMA 培养基上,置于 28 °C 恒温培养,3—5 d 后观察生长状况,记录结果。

1.4.3 重金属抗性测定

选取铅、镍、汞、铬、铜的重金属盐母液与 YMA 培养基分别湿热灭菌,倒平板前混合均匀,加入 0.5 mmol/L EDTA,配置最终浓度 Pb^{2+} :2、3、4、5 mmol/L; Ni^{2+} :1.0、1.2、1.4、1.6 mmol/L; Hg^{2+} :0.025、0.05、0.075、0.1 mmol/L; Cr^{6+} :0.3、0.6、0.9、1.2 mmol/L; Cu^{2+} :0.15、0.35、0.5、0.7、0.9、1.2 mmol/L。以正常 YMA 培养基为对照,每一个处理 3 次重复。接种筛选菌株后,置于 28 °C 恒温培养 3—5 d 观察生长状况,记录结果。

1.5 溶磷菌株生理生化和细胞形态特征测定

按照东秀珠方法^[18],对筛选溶磷菌株进行生理生化特性分析,菌体特征包括革兰氏染色、芽孢染色和菌体大小等指标的测定。

1.6 16S rDNA 和 *recA* 基因的序列测定及系统发育分析

采用细菌基因组 DNA 试剂盒 OSR-M502 (天根生化科技有限公司生产)提取细菌基因组 DNA,进行 16S rDNA 和 *recA* 基因的扩增。所用引物、扩增体系、反应条件见文献^[15,19],扩增产物送北京奥科鼎盛生物科技有限公司测序,根据测序结果,将扩增得到的序列在 GenBank 中进行 BLAST 分析,用 DNAMAN6.0 进行序列相似性分析,通过 Clustal-X1.81 和 TREECONW 软件(version 1.3b),以 Neighbor-joining 方法构建系统发育树,用 Bootstrap(1000 次重复)进行检验。

1.7 接种试验

对筛选菌株进行大豆幼苗的接种试验。选取饱满、健康、大小均一的大豆种子,进行表面消毒、发芽、接种和盆栽试验,接种无菌水的幼苗为对照(Control Check, CK),具体参见文献^[15]。生长 1 个月记录鲜重、苗高。另外,选用 1 株大豆根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* UDSA205^T为参考,并与大豆根瘤内生菌的促生作用进行比较,统计其结瘤和植物促生指标(即鲜重和苗高)。用 SPSS 11.0 软件统计分析,评价接种内生菌对幼苗植株生长的影响。

2 结果与分析

2.1 溶磷性测定

2.1.1 筛选结果

324 株大豆根瘤内生菌接种在无机磷培养基上,测定溶磷圈直径和菌落直径大小。结果发现,溶磷性内生菌共有 36 株。从初筛结果中选取 20 株溶磷能力较强的菌株进行复筛,结果表明,溶磷能力最强的菌株为 DD291, D/d 为 3.550(表 1)。

2.1.2 液体培养基中内生菌溶磷效果

平板筛选 20 株溶磷能力较强的内生菌,在液体条件下震荡培养均有溶磷能力。发酵液中可溶性磷含量和对照相比增加 1—11.9 倍。溶磷量大于 300 mg/L 的有 9 株(DD291、DD284、DD283、DD140、DD142、DD167、DD161、DD312、DD311),其中菌株 DD291 发酵液中可溶性磷含量最高(452 mg/L),DD284 次之(439 mg/L)。发酵液 pH 值与对照相比,均有不同程度下降,最大降幅达 2.92 个 pH 单位。可溶性磷增加与 pH 值降低有一定相关性,但 pH 值相近菌株的溶磷量也存在差异(图 1)。

2.2 溶磷性内生菌抗性测定

2.2.1 耐盐能力

由表 2 可见,20 株菌均可耐受 4% 和 5% 盐浓度,18 株菌可耐受 6% 盐浓度,7 株菌(DD028、DD140、DD167、DD186、DD283、DD284、DD167)可耐受 7% 盐浓度,其中 1 株菌(DD140)可耐受 8% 盐浓度,9% 盐浓度无存活菌株。说明筛选出的部分溶磷性内生菌在 4%—6% NaCl 浓度培养基上具有较强耐受性,最大可耐受

含 8% 的盐浓度。

表 1 大豆根瘤溶磷性内生菌复筛结果

Table 1 The secondary screening results of dissolved inorganic phosphorus by endophytic bacteria from soybean nodules			
菌株 Strains	溶磷圈直径(D)/cm Diameter of dissolved phosphorus halo	菌落直径(d)/cm Colony diameter	比值(D/d) Ratio
DD291	3.97±0.121	0.42±0.052	3.550±0.327a
DD284	3.93±0.121	0.47±0.041	3.460±0.146b
DD283	2.87±0.110	0.83±0.121	3.458±0.163bc
DD140	2.13±0.369	0.65±0.328	3.277±0.051a
DD167	3.72±0.325	1.18±0.172	3.153±0.065a
DD186	3.68±0.264	1.13±0.200	3.257±0.024a
DD028	3.53±0.372	1.15±0.327	3.070±0.049a
DD264	2.88±0.075	1.43±0.110	2.014±0.203bc
DD273	2.83±0.121	1.57±0.121	1.803±0.163bc
DD272	1.98±0.130	1.43±0.151	1.385±0.218bc
DD312	1.93±0.163	1.47±0.163	1.313±0.203bc
DD270	1.87±0.121	1.65±0.105	1.133±0.067bc
DD274	0.88±0.117	0.68±0.117	1.294±0.057c
DD142	2.43±0.258	1.92±0.147	1.266±0.057a
DD161	2.27±0.301	1.82±0.248	1.247±0.036a
DD168	2.45±0.123	1.97±0.186	1.244±0.063a
DD138	2.30±0.219	1.87±0.187	1.230±0.030a
DD062	2.37±0.163	1.93±0.163	1.228±0.037a
DD125	2.55±0.321	2.08±0.232	1.226±0.046a
DD126	2.40±0.190	1.97±0.186	1.218±0.035a

菌落上透明圈直径、菌落直径均为培养 4—7 d 测得 6 次重复的平均值±标准差,数据后小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)

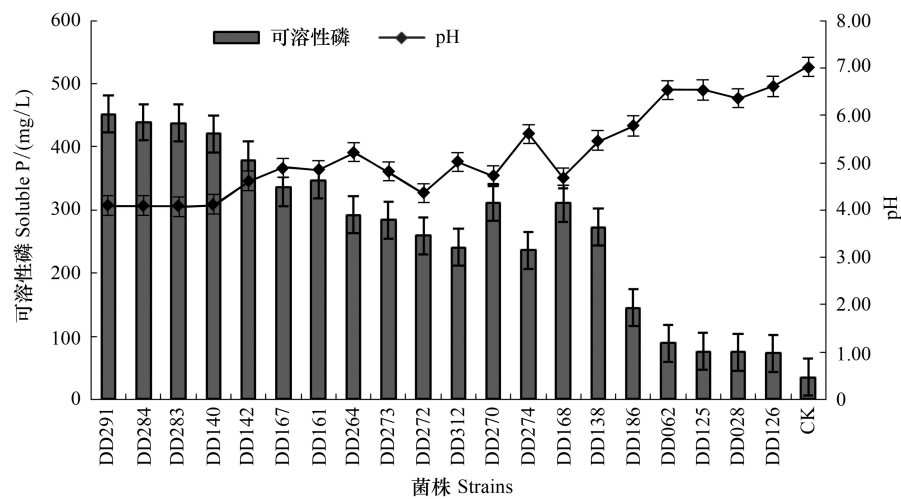


图 1 液体培养条件下内生菌对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的溶解能力

Fig.1 Dissolving capacity of endophytic bacteria to $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ under liquid culture conditions

表 2 内生菌对不同 NaCl 浓度耐受性

Table 2 The tolerance of endophytic bacteria to different concentration of NaCl						
NaCl 浓度 NaCl concentration/%	4	5	6	7	8	9
存活菌株 Survival strains	20	20	18	7	1	0
比例 Proportion/%	100	100	90	35	5	0

2.2.2 耐酸碱能力

对耐盐的 7 株菌接种在 pH 值 5—11 培养基上(表 3),培养 3 d 后观察,7 株菌在 pH 值 8—10 培养基上均能很好生长,在 pH 值 6 时菌株生长仅次于对照,在 pH 值 5 时菌株 DD140、DD283、DD291 可生长,说明这些菌株有一定耐酸能力。在 pH 值 11 下菌株 DD283、DD284 均不能生长,DD291 生长仅次于对照,其余 4 株菌(DD028、DD140、DD167、DD186)能存活,说明一些溶磷性内生菌株具有较强耐碱性。

表 3 pH 对溶磷性内生菌生长的影响
Table 3 The effect of pH on growth of soluble phosphorus endophytes

pH	5	6	8	9	10	11	对照/CK
DD028	+	++	++	++	++	+	+++
DD140	++	++	+++	+++	+++	+	+++
DD167	-	++	+++	+++	++	+	+++
DD186	-	++	+++	+++	+++	+	+++
DD283	++	++	+++	+++	++	-	+++
DD284	+	++	+++	++	+++	-	+++
DD291	++	+++	+++	+++	+++	++	+++

“+++”表示菌株生长很好,“++”表示菌株生长良好,“+”表示菌株存活,“-”表示菌株不能生长

2.2.3 重金属抗性

由表 4 可知,7 株菌对 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cr^{6+} 和 Cu^{2+} 有较强耐受性。耐受 5 mmol/L Pb^{2+} 的有 3 株(DD186、DD284、DD291),能耐受 4 mmol/L Pb^{2+} 的有 3 株,能耐受 3 mmol/L Pb^{2+} 的仅有 1 株。在 1.0 mmol/L Ni^{2+} 浓度时仅有 DD283 存活,其余菌株生长受严重抑制。能耐受 0.05 mmol/L Hg^{2+} 有 2 株,其余 5 株均能耐受 0.025 mmol/L Hg^{2+} 。能耐受 1.2 mmol/L Cr^{6+} 的有 6 株,耐受 0.9 mmol/L Cr^{6+} 的仅有 1 株(DD186)。能在 Cu^{2+} 浓度为 1.2 mmol/L 的培养基上生长的仅有 DD028,能耐受 0.9 mmol/L 的有 4 株,能耐受 0.7 mmol/L Cu^{2+} 的仅有 2 株(DD167、DD186)。总之,在设置的重金属浓度范围内,7 株溶磷菌中仅有 1 株菌 DD283 可同时耐受 5 种重金属,其余 6 株可同时耐受 4 种不同浓度的重金属。

表 4 溶磷菌株重金属抗性
Table 4 Heavy metal toxicity testing of the soluble phosphorus endophytes

菌株 strain	重金属浓度 Heavy metal concentration/(mmol/L)				
	Pb^{2+}	Ni^{2+}	Hg^{2+}	Cr^{6+}	Cu^{2+}
DD028	4.0	—	0.050	1.2	1.2
DD140	4.0	—	0.025	1.2	0.9
DD167	4.0	—	0.050	1.2	0.7
DD186	5.0	—	0.025	0.9	0.7
DD283	3.0	1.0	0.025	1.2	0.9
DD284	5.0	—	0.025	1.2	0.9
DD291	5.0	—	0.025	1.2	0.9

—:菌株在所设重金属浓度下不能生长

2.3 溶磷菌株菌落、生理生化和细胞形态特征

筛选结果表明,筛选出 7 株内生菌进行细胞形态特征和生理生化特性测定(表 5)。在固体培养基上培养 48h,菌株 DD028、DD140、DD167、DD186 的菌落呈不透明或半透明突起,菌落边缘不规则,呈乳白色且湿润,菌落直径 1—5 mm。菌体经革兰氏染色呈杆状或短棒状,菌体大小 $(0.96\text{—}1.27)\times(1.44\text{—}4.36)\text{ }\mu\text{m}$,革兰氏染色呈阳性,有芽孢生成。DD283、DD284 均为革兰氏阴性菌,无芽孢生成,菌落呈半透明或不透明,突起、边缘圆整、湿润,菌体呈短杆状或球状。菌株 DD291 菌落半透明、突起,边缘圆整、乳白、湿润,菌体杆状,大小 $(0.11\text{—}0.26)\times(1.54\text{—}1.92)\text{ }\mu\text{m}$,革兰氏阴性,无芽孢。

表 5 筛选菌株生理生化和细胞特征

Table 5 Physiological and biochemical tests and cell characteristics of screened strains

理化特性 Physiological and biochemical characteristics	DD028	DD140	DD167	DD186	DD283	DD284	DD291
接触酶 Catalase test	+	+	+	+	+	+	+
V-P 试验 V-P test	+	+	+	+	+	+	-
D-葡萄糖产酸 D-glucose acid yield	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖产酸 L-Arab sugar acid yield	-	-	+	+	-	-	+
D-甘露醇 D-mannitol	-	+	-	+	+	+	+
木糖 Xylose	-	-	+	-	-	-	+
肉汤 Broth (pH5.0)	+	+	+	+	+	+	+
淀粉 Starch	+	+	+	+	+	+	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine transaminase	-	-	-	-	-	-	+
卵黄磷脂酶 Lecithinase	+	+	+	+	+	+	+
硝酸还原酶 Nitrate reductase	+	+	+	+	+	+	+
酪素分解 Casein decomposition	+	+	+	+	+	+	+
柠檬酸盐 Citrate utilization	+	+	+	+	+	+	-
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysate	+	+	+	+	+	+	-
形态 Morphology	短杆状	杆状	杆状	短杆状	球状	短杆状	杆状
菌体大小 Strain size/ μm	$(0.96-1.05) \times$ $(1.44-1.92)$	$(1.27-1.35) \times$ $(4.36-4.52)$	$(0.96-1.25) \times$ $(2.5-2.88)$	$(0.96-1.44) \times$ $(1.92-2.40)$	0.22—0.27	$(0.6-1.1) \times$ $(1.2-2.5)$	$(0.11-0.26) \times$ $(1.54-1.92)$
革兰氏染色 Gram stain	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁺	G ⁻	G ⁻	G ⁻
芽孢有无 Spore forming	+	+	+	+	-	-	-

“+”表示阳性,“-”表示阴性

2.4 筛选菌株系统发育分析

筛选出 7 株菌的 16S rDNA 和 *recA* 基因经 PCR(Polymerase Chain Reaction)扩增表明,扩增产物长度分别为 1.5 kb 和 485 bp,在 GenBank 中的序列登记号为 KJ596324-KJ596330,KM216215-KM216221。将菌株序列与模式菌株或参比菌株序列进行比对,16S rDNA 序列分析结果表明,菌株 DD283、DD284 与菌株 *Enterobacter ludwigii* EN-119^T(AJ853891)、*Enterobacter cancerogenus* LMG 2693^T(Z96078)位于系统发育树分支 I 的同一小分支上(图 2),与模式菌株 *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693^T(Z96078)、*Enterobacter ludwigii* EN-119^T(AJ853891)的同源性分别为 99.7%和 98.3%。而持家基因 *recA* 系统发育分析(图 3)表明 DD283、DD284 与 *Enterobacter cancerogenus* ICMP5706 (DQ859855)(同源性 98.9%)、*Enterobacter cloacae* SA-ENCLREC25 (HF569037)(同源性 99.2%)分别有最大同源性。结合其理化特性和培养特征,分别属于 *Enterobacter cancerogenus*,*Enterobacter cloacae*。菌株 DD291 位于 16S rDNA 系统发育树分支 II 上,与模式菌株 *Pseudomonas putida* ATCC 12633^T(AF094736)具有最大的同源性(99.3%),而 *recA* 系统发育分析中与 *Pseudomonas putida* 具有最高同源性,支持了 16S rDNA 的系统发育地位,结合理化特征和形态学特征,DD291 属于 *Pseudomonas putida*。菌株 DD028、DD140、DD167 和 DD186 位于系统发育分支 III 上,且它们与模式株 *Bacillus cereus* ATCC14579^T(AF290547)具有最高同源性,均为 100%,而 *recA* 系统发育分析结果(同源性分别为:97.7%、96.7%、98%、98%)进一步印证了 16S rDNA 的系统发育地位,结合生理生化特征以及培养特征,这 4 株菌均属于 *Bacillus cereus*。

2.5 内生菌接种对幼苗的影响

由表 6 可知,接种内生菌、根瘤菌与对照相比,苗高均有所增加,但是并非全部显著增加,仅 *Sinorhizobium fredii* USDA205^T、DD284、DD186、DD167,分别显著增加了 35.43%、29.86%、27.06%、29.86%,*S. fredii* USDA205^T增加最多,DD284、DD167 次之。对幼苗鲜重的影响除 DD284 外均有显著增重,接种根瘤菌 *S. fredii* USDA205^T的增重最多(104%),DD167 次之(58.46%)。但是,单独接种内生菌均不能使幼苗结瘤。

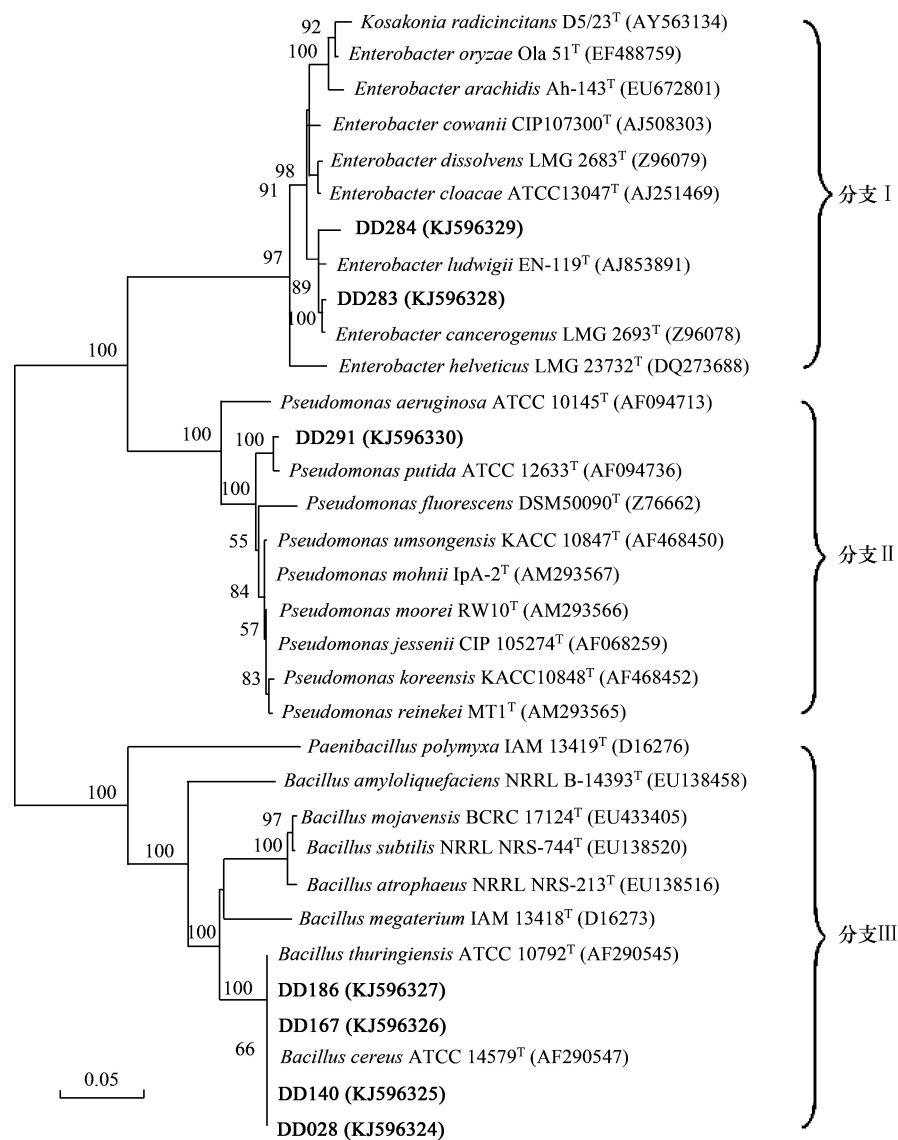


图2 溶磷性内生菌株 16S rDNA 序列系统发育树(系统发育树分支上的数值表示大于 50% 的自举值,括号里是 GenBank 登录号,粗体是待测菌株,标尺指核苷酸替代数)

Fig.2 Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences of selected strains (Bootstrap values (1000 replicates) above 50% are indicated above the branches. Strains tested are labeled in bold. Scale bar indicates 0.05% substitution of nucleotide)

表6 内生菌接种大豆幼苗试验结果

Table 6 Results of inoculation tests

菌株 Strains	苗高/cm Seedling shoot length	鲜重/(g/株) Seedling fresh weight	瘤数/(个/株) Number of nodules
DD284	34.31±1.92a *	11.23±1.65cd	0a
DD283	32.53±0.72ab	12.31±1.18bc	0a
DD291	31.46±3.82ab	13.15±0.61bc	0a
DD186	33.57±2.56a	12.54±0.60bc	0a
DD167	34.31±1.03a	14.23±0.57b	0a
DD140	33.29±1.22ab	13.16±1.19bc	0a
DD028	29.14±5.18ab	13.72±0.31bc	0a
CK	26.42±0.80b	8.98±0.09d	0a
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA205 ^T	35.78±0.46a	18.32±1.22a	28b

* 表中数据为测得 3 次重复的平均值±标准差,数据后不同小写字母表示差异显著 (P<0.05)

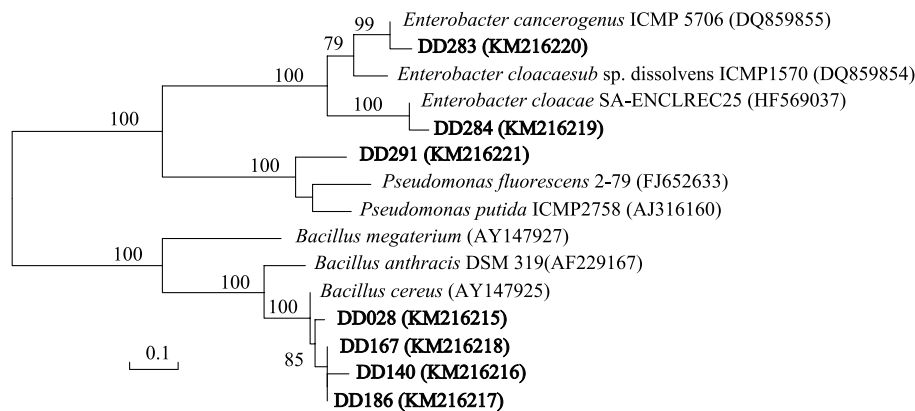


图3 溶磷性内生菌株 *recA* 基因序列系统发育树(系统发育树枝上的数值表示大于50%的自举值,粗体是待测菌株,标尺指核苷酸替代数)

Fig.3 Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method based on *recA* gene sequences of selected strains (Bootstrap values (1000 replicates) above 50% are indicated above the branches. Strains tested are labeled in bold. Scale bar indicates 0.05% substitution of nucleotide)

3 讨论

一般认为微生物生长代谢过程中分泌出 H^+ 、有机酸、磷酸酶以及通过降解底物释放磷,同时伴随溶磷菌无机盐呼吸和同化 NH_4^+ 时也可释放 H^+ ^[20]。产生的酸既能降低 pH 值,又可与铁、铝、钙等离子结合,从而使难溶性磷酸盐溶解^[2],其作用大小不仅取决于分泌酸种类和数量,还与其缓冲性能以及有机酸螯合离子 (Ca^{2+}) 多少有关^[20]。本试验中,可溶性磷增加而 pH 值有一定降低,但部分 pH 值相近菌株溶磷量又存在差异。这与赵小蓉等^[5,21-22] 研究结果一致,溶磷菌在培养过程中分泌出一些物质,导致 pH 值降低。Illmer 和 Schinme^[23] 认为,分泌物质对培养基介质酸度没有影响,但能与钙离子产生络合或螯合作用,使磷酸盐溶解。本试验涉及到磷源仅为磷酸钙,还需对其溶磷能力进行全面评估。因此,开展对多种形式磷源进行内生菌解磷能力测定^[20]、溶磷相关基因扩增与克隆以及内生菌溶磷机制仍需进一步研究。

研究表明,芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 是豆科根瘤中常见内生菌,能够产生大量溶磷物质、生长素等代谢产物,促进了土豆、番茄、拟南芥、大米、谷物、油菜、可可、豇豆、鹰嘴豆等作物产量的提高^[24-28]。本研究筛选的溶磷性内生菌 DD028、DD140、DD167、DD186 均属于 *Bacillus*,由于其形成芽孢,有助于该类细菌在低温、高温和干旱等逆境条件下长期存在,形成优势种群,且具有较强耐盐碱能力和重金属抗性,比较适于溶磷菌肥的开发和利用。研究表明^[25-28] 芽孢菌可快速定殖在小麦、土豆、玉米、草坪、蚕豆、可可和黄瓜根部,诱导宿主发生生理变化和系统抗性,提高作物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力。Bai 等^[29] 从大豆根瘤中分离出 3 株内生菌均属于 *Bacillus* (归属于 *B. subtilis*, *B. thuringiensis*),单独接种不能促使宿主结瘤和重量增加,但这 3 株菌和 *Bradyrhizobium japonicum* 联合接种,在无氮条件下均能增加植株的重量。这和本研究结果不太一致,单独接种内生菌 DD284、DD186、DD167 与对照相比,不仅均增加了植物的株高,除 DD284 外,鲜重也均有显著增加。这可能与内生菌不同种、属(试验筛选菌株为 *Enterobacter cancerogenus*、*Pseudomonas putida*、*Bacillus cereus*) 的菌株特性有关,如这些菌株都具溶磷特性和部分有较强抗逆性。本研究中,对大豆单接种根瘤菌 *Sinorhizobium fredii* USDA 205^T 时,与单接种溶磷菌相比,其苗高和鲜重均为最高,也有根瘤产生,说明,对豆科植物来说,根瘤菌的促生作用要显著高于溶磷菌的促生作用。菌株的其他促植物生长特性如代谢产物 IAA (indole-3-acetic acid)、铁载体,以及溶磷菌和根瘤菌混合接种大豆等工作正在研究之中。

Enterobacter cloacae 是兼性厌氧细菌,分离自水稻根际,具有较强的固氮能力,在培养过程中可产生乳酸和氢、二氧化碳、氨等大量气体,并能排出一些含肽物质^[30]。且可通过产生 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylate) 转氨酶降低宿主植株体内乙烯水平,促进根的伸长^[31]。此外,也用于水果和蔬菜采后生物防治以

及预处理种子防止倒伏病的发生。如 *E. cloacae* CAL2 和 UW4 可以促进油菜根系生长;*E. cloacae* UW5 合成植物激素 IAA,增加根毛的数量和侧根长度^[32]。*E. cloacae* RRC 101 定殖于玉米植株内,作为根部内共生体防治枯萎病的发生^[33]。本实验中内生菌 DD284 除具溶磷作用外,还兼有耐重金属和耐盐碱作用,这对适应大田环境具有重要的应用价值。

菌株 DD291 属于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),是一种广泛分布于陆地和水生环境的菌株,在豆科植物根瘤中也常被分离出^[34],是溶解无机磷的主要内生菌。对宿主植物具有促生长作用,如 *P. putida* GR12-2 可定殖在宿主植物根部,促进根毛的形成,增加侧根的数量和长度^[35]。基因组分析^[34]证实了 *P. putida* KT2440 的无毒性 and 安全性,为环境生物技术方面的应用提供了理论基础。

本试验中,耐受 7%NaCl 的内生菌 DD283、DD284、DD028 不仅表现出较强溶磷特性,而且对 pH 值、重金属铅、铬、铜也有较强耐受性。7 株菌均能耐受 4 种以上重金属,这可能是内生菌通过分泌质子、氨基酸以及各种有机酸,提高体系酸度,溶解重金属,或利用代谢产物与重金属配合改变形态,使其对多种金属具有耐受性^[36]。因此,溶磷能力较强菌株对某些重金属也兼有较强耐受性,可能与菌体长期进化形成的适应机制有关。微生物为了适应胁迫环境,体内形成了 6 类相应的抗性 or 解毒机制^[37],包括细胞外排、胞外沉淀、胞内扣押或隔离、主动输出、酶类解毒及降低细胞对重金属敏感性,这可能与菌株遗传特性及生存环境有关。从大豆根瘤特定微环境分离筛选出溶磷、耐金属和盐碱的优良菌株,调节和改善宿主生长环境,对促进我国农业和生态可持续发展有重要意义。

致谢:温州医科大学附属第一医院转化医学研究所赖心河博士对本文写作给予帮助,特此致谢。

参考文献 (References):

- [1] Bhattacharyya P N, Jha D K. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350.
- [2] Ahemad M, Kibret M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*, 2014, 26(1): 1-20.
- [3] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, Shen F T, Lai W A, Young C C. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(1): 33-41.
- [4] 孙珊, 黄星, 范宁杰, 冯昭中, 李会会, 李顺鹏. 一株溶磷细菌的分离、鉴定及其溶磷特性研究. *土壤*, 2010, 42(1): 117-122.
- [5] 黄静, 盛下放, 何林燕. 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. *微生物学报*, 2010, 50(6): 710-716.
- [6] 刘文干, 何园球, 张坤, 樊建波, 曹慧. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性. *微生物学报*, 2012, 52(3): 326-333.
- [7] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(8): 827-837.
- [8] 王辰月, 陈秀蓉, 杨成德, 叶震, 李振东. 线叶蒿草内生细菌的鉴定及溶磷效果的初步研究. *甘肃农业大学学报*, 2011, 46(3): 99-103.
- [9] 张丽珍, 冯利利, 蒙秋霞, 牛宇, 牛伟, 樊晶晶, 鹿茸. 一株柠条内生解磷菌的分离鉴定及实时荧光定量 PCR 检测. *生态学报*, 2013, 33(13): 3941-3946.
- [10] 郑燕玲. 石斛兰(*Dendrobium chrysopetrum*)内生菌的分离及其生物防治功能研究 [D]. 广州: 中山大学, 2006.
- [11] 张国霞, 茅庆, 何忠义, 谭志远. 陵水普通野生稻(*Oryza rufipogon*)内生菌的固氮及溶磷特性. *应用与环境生物学报*, 2006, 12(4): 457-460.
- [12] 蒋国彪. 小麦溶磷内生菌的筛选鉴定及其溶磷特性的初步研究 [D]. 成都: 四川师范大学, 2012.
- [13] Li, J H, Wang E T, Chen W F, Chen W X. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(1): 238-246.
- [14] Bai Y M, D'Aoust F, Smith D L, Driscoll B T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(3): 230-238.
- [15] Zhao L F, Deng Z S, Yang W Q, Cao Y, Wang E T, Wei G H. Diverse rhizobia associated with *Sophora alopecuroides* grown in different regions of Loess Plateau in China. *Systematic and Applied Microbiology*, 2010, 33(8): 468-477.
- [16] Deng Z S, Zhao L F, Kong Z Y, Yang W Q, Lindström K, Wang E T, Wei G H. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the

- Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China. *FEMS Microbiology Ecology*, 2011, 76(3): 463-475.
- [17] Katznelson H, Bose B. Metabolic activity and phosphate-dissolving capability of bacterial isolates from wheat roots, rhizosphere, and non-rhizosphere soil. *Canadian Journal of Microbiology*, 1959, 5(1): 79-85.
- [18] Zhao L F, Xu Y J, Ma Z Q, Deng Z S, Shan C J, Wei G H. Colonization and plant growth promoting characterization of endophytic *Pseudomonas chlororaphis* strain Zong1 isolated from *Sophora alopecuroides* root nodules. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44(2): 623-631.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统和鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001: 365-365.
- [20] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(4): 389-395.
- [21] 赵小蓉, 林启梅, 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*, 2003, 23(3): 5-7.
- [22] 冯瑞章, 冯月红, 姚拓, 龙瑞军, 康爱明. 春小麦和苜蓿根际溶磷菌筛选及其溶磷能力测定. *甘肃农业大学学报*, 2005, 40(5): 604-608.
- [23] Illmer P, Schinner F, Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 1995, 27(3): 257-263.
- [24] Khan M R, Fischer S, Egan D, Doohan F M. Biological control of *Fusarium* seedling blight disease of wheat and barley. *Phytopathology*, 2006, 96(4): 386-394.
- [25] Wang H L, Wen K, Zhao X Y, Wang X D, Li A Y, Hong H Z. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus* sp. strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. *Crop Protection*, 2009, 28(8): 634-639.
- [26] 黄秋斌, 张颖, 刘凤英, 王森, 王刚. 蜡样芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果. *生态学报*, 2014, 34(10): 2559-2566.
- [27] Leite H A C, Silva A B, Gomes F P, Gramacho K P, Faria J C, de Souza J T, Loguercio L L. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2639-2651.
- [28] Sharma S, Gaur R K, Choudhary D K. Phenetic and functional characterization of endophytic root-nodule bacteria isolated from chickpea (*Cicer arietinum* L.) and mothbean (*Vigna aconitifolia* L.) of arid-and semi-arid regions of Rajasthan, India. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2012, 15: 889-894.
- [29] Bai Y M, D'Aoust F, Smith D L, Driscoll B T. Isolation of plant-growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48(3): 230-238.
- [30] 尤崇杓, 里景伟, 宋未, 张荣菊, 周淑萍, 叶松广. 固氮阴沟肠细菌(*Enterobacter cloacae*)某些生理特性的研究. *植物生理学报*, 1981, 7(1): 43-48.
- [31] Shah S, Li J P, Moffatt B A, Glick B R. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 1998, 44(9): 833-843.
- [32] Ryu R J, Patten C L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(21): 7200-7208.
- [33] Hinton D M, Bacon C W. *Enterobacter cloacae* is an endophytic symbiont of corn. *Mycopathologia*, 1995, 129(2): 117-125.
- [34] Nelson K E, Weinle C, Paulsen I T, Dodson R J, Hilbert H, Martins dos Santos V A P, Fouts D E, Gill S R, Pop M, Holmes M, Brinkac L, Beanan M, DeBoy R T, Daugherty S, Kolonay J, Madupu R, Nelson W, White O, Peterson J, Khouri H, Hance I, Chris Lee P, Holtzapple E, Scanlan D, Tran K, Moazzes A, Utterback T, Rizzo M, Lee K, Kosack D, Moestl D, Wedler H, Lauber J, Stjepandic D, Hoheisel J, Straetz M, Heim S, Kiewitz C, Eisen J A, Timmis K N, Dusterhöft A, Tümmeler B, Fraser C M. Complete genome sequence and comparative analysis of the metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 2002, 4(12): 799-808.
- [35] Hong X, Pasternak J J, Glick B R. Isolation and Characterization of Mutants of the Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR_{12.2} that overproduce indoleacetic acid. *Current Microbiology*, 1996, 32(6): 67-71.
- [36] 曹莹, 马宁, 常佳丽, 赵龙飞, 孔召玉, 李哲斐, 韦革宏. 西北部分矿区豆科植物根瘤菌重金属抗性及其 16S rDNA RFLP 分析. *农业环境科学学报*, 2010, 29(6): 1156-1163.
- [37] Bruins M R, Kapil S, Oehme F W. Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45(3): 198-207.