

DOI: 10.5846/stxb201906211315

刘萍, 夏江宝. 滨海盐碱地根际溶磷细菌磷素转化特征. 生态学报, 2021, 41(11): 4531-4540.

Liu P, Xia J B. Properties of rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria in coastal saline and alkaline land. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(11): 4531-4540.

滨海盐碱地根际溶磷细菌磷素转化特征

刘 萍^{1,2,*}, 夏江宝²

¹ 滨州学院生物与环境工程学院, 滨州 256600

² 山东省黄河三角洲生态环境重点实验室, 滨州 256600

摘要:为探讨溶磷细菌对土壤磷素的转化效果,提高黄河三角洲盐碱地土壤肥力。从黄河三角洲盐地碱蓬根际土壤选取一株高效溶磷细菌 RPB03,采用单因子实验,探究不同环境因子对 RPB03 菌株溶磷效果的影响。结果表明:RPB03 菌株为 *Pantoea vagans*, 隶属泛菌属。在密闭培养方式下,溶磷菌 RPB03 菌株在较高的盐度、温度和碱性条件下,溶磷量皆达到 300 mg/L 以上,溶磷能力良好。盆栽实验结果表明,该菌可有效促进土壤中无效态磷向有效态磷的转化(有效磷含量从 0.029 mg/kg 提升至 0.043 mg/kg)。研究表明,RPB03 菌株是一株耐盐碱性较强的高效溶磷细菌,适合在黄河三角洲盐碱地中生存,且其存在对提升黄河三角洲盐碱土壤有效磷含量具有促进作用。

关键词:溶磷菌;耐盐碱性;土壤肥力;泛菌

Properties of rhizosphere phosphate-solubilizing bacteria in coastal saline and alkaline land

LIU Ping^{1,2,*}, XIA Jiangbao²

¹ Biology and Environmental Engineering College, Binzhou University, Binzhou 256600, China

² Shandong Key Laboratory of Eco-environmental Science for Yellow River Delta, Binzhou 256600, China

Abstract: In order to improve the soil fertility of saline-alkali land in the Yellow River delta, we analyzed the effect of phosphate-solubilizing bacteria on phosphorus conversion. The single factor experiment was used to analyze the phosphorus solubilizing ability of RPB03 strain selected from the rhizosphere soil of *Suaeda salsa* in the Yellow River delta under the different environmental factors. The results showed that RPB03 strain was named *Pantoea vagans*, belonging to *Pantoea*. In the closed culture system, RPB03 strain showed effective phosphate solubilizing ability that the dissolved phosphorus content was exceeding 300mg/L under higher salinity, temperature and alkaline conditions. The results of pot experiment showed that RPB03 strain could effectively promote the conversion of the invalid phosphorus to the available phosphorus in soil (the soluble phosphorus content increased from 0.029 mg/kg to 0.043 mg/kg). Therefore, the strain RPB03 was a kind of effective phosphate-solubilizing bacteria with strong salt and alkali tolerance, which was suitable for survival in the saline-alkali land of the Yellow River delta, and its existence could promote available phosphorus content in the saline-alkali soil.

Key Words: Phosphate solubilizing bacteria; saline-alkaline resistance; soil fertility; *Pantoea*

黄河三角洲盐碱地土地资源丰富,而土壤养分转化是盐碱地植被生长及其生产力的主要限制因素之一^[1],其中,磷素是植物生长发育所需的主要养分之一^[2-4],主要存在于植物的核酸及细胞膜磷脂等,并通过

基金项目:山东省自然科学基金项目(ZR2017LEE023);国家自然科学基金项目(31770761);山东省林业科技创新项目(2019LY006);泰山学者工程专项经费

收稿日期:2019-06-21; **网络出版日期:**2021-04-06

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: liuping0527@126.com

植物的一系列生理活动促进作物生长^[5]。植物中的磷主要从土壤中获取,其含量约为干重的 0.2%。据研究,盐碱地磷库源相对丰富,但是可用于生物合成的磷不仅仅取决于土壤中磷库总量,还取决于其溶解度,而溶解度又取决于土壤中磷的化学反应和生物相互作用^[6-7]。由于盐渍土壤含有较多的碱性物质,致使部分磷素库源不能被植物直接吸收利用,而是被固化形成难溶性的磷酸钙盐;同时,土壤中的金属离子,包括 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 等物质,同样可与磷元素形成难溶性磷酸盐,这部分不能被植物体直接吸收的磷库源,称为无效态磷^[8]。因此,如何将无效态磷转化为有效态磷,提高土壤有效磷含量,这一问题越来越受到国内外诸多科研工作者的关注,也是本研究的主要目的。

探明盐碱地生境中土壤肥力的提升途径与机制,尤其是有效磷含量的提高途径,对提高盐碱地土地利用及植被种类和生物量,具有较大意义^[9]。植物根际微生物种类和数量较丰富,与植物共存形成了根际圈微生物群落,对植物的生长、抗病性及生物产量提高等多方面具有积极的意义^[10-13]。其中溶磷微生物 (phosphate solubilizing microorganisms, PSM) 是土壤微生物的主要类群之一,同时也是根际微生物的重要组成部分^[14],能将难溶性的磷酸盐如矿磷粉转化成为植物可吸收利用的磷素,对提高土壤有效磷含量、缓解植物盐碱胁迫损伤及改良盐碱土具有积极作用^[8]。

本实验对黄河三角洲滨海盐碱地典型盐生植物碱蓬根际土壤溶磷微生物进行了研究。采用改良的 PKO 培养基,共筛选出 17 株溶磷菌。通过复筛,得到一株溶磷效果较好的耐盐碱溶磷细菌,对其溶磷能力进行了研究,希望能为改良盐碱地、提升土壤肥力提供一点理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验菌株

从黄河三角洲盐地碱蓬根际土壤中筛选了一株溶磷细菌,其编号为 RPB03。菌落粘稠,中间隆起,边缘光滑,呈淡黄色,革兰氏染色阴性。

1.1.2 培养基

溶磷微生物初次分离采用改良的 PKO 培养基^[15-16],液体菌种培养采用牛肉膏蛋白胨液体培养基,溶磷能力研究以 PKO 培养基为基础培养基。

牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g、水 1000 mL,用 NaOH 调 pH 7.4—7.6。

改良 PKO 培养基:葡萄糖 10.0 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.50 g、NaCl 0.20 g、KCl 0.20 g、 MgSO_4 0.03 g、 MnSO_4 0.03 g、 FeSO_4 0.03 g、蒸馏水 1000 mL。pH 8.0—8.2。

1.1.3 仪器和试剂

恒温摇床,超净工作台,光照培养箱,紫外分光光度计,GTR10-1 型高速冷冻离心机。试验试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 土样采集及溶磷微生物分离与纯化

采集黄河三角洲盐地碱蓬根际土壤置入无菌袋内,带回实验室。采用涂布平板法进行微生物分离培养,纯化后,接种于 PKO 培养基培养 12 d,观察平板,记录菌落直径及溶磷圈直径,并计算溶磷系数。

溶磷系数 = H/C (H 表示溶磷圈直径, C 表示菌落直径)。

1.2.2 溶磷动力学曲线测定

将 RPB03 菌株活化后,接种于牛肉膏蛋白胨固体培养基平板中培养 24 h。用无菌接种环取一环接入 200 mL PKO 液体培养基中混匀,置于 30℃ 摇床培养。分别在 0 d、1 d、2 d、3 d、4 d、5 d 及 6 d 吸取培养液,用钼锑比色法测定溶液中有效磷含量^[17],用分光光度法在 600 nm 下测定菌体细胞吸光度值。

1.2.3 培养条件

将保存的菌种 RPB03 活化,液体培养 36 h,离心取菌体,洗涤后用 PKO 液体培养基活化,取 1 mL (含菌量

为 10^8 菌落数/mL) 的种子液转接入 PKO 培养基,按照下列条件进行摇床培养。培养 48h 后,10000 rpm/min 离心 15 min,滤液过 0.22 μm 微孔滤膜后,测定有效磷含量。

pH 值设置 6、7、8、9 和 10;温度设置 10℃、25℃、30℃、35℃、40℃、45℃;转速设置为 50、90、130、170 和 210 rpm/min;盐浓度设置分别为 0%、1%、2.5%、5%、7.5% 和 10%;碳源分别用麦芽糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖和葡萄糖作碳源;氮源分别为硝酸钾、硝酸铵、硫酸铵、尿素、氯化铵。碳源和氮源添加量分别是 10 g 和 0.5 g。

1.2.4 菌株 RPB03 对盐渍土壤磷素转化效果

供试土壤类型为盐碱化潮土母质土壤,土壤理化性状:全磷 0.530 g/kg、全钾 0.943 g/kg、碱解氮 0.086 g/kg、速效磷 0.029 g/kg,pH 8.0,含盐量 0.34%。

(1) 对裸斑盐渍土壤磷素转化效果

取两份等量的黄河三角洲盐碱土,分为控制组和实验组,控制组土壤采用干热灭菌法进行土壤灭菌,用烘箱 170℃ 烘干 2 h,实验组土壤不做任何处理。两份土壤分别置于经无菌处理的花盆内,将培养 36 h 的 RPB03 细菌细胞施入花盆,在处理第 0 天、30 天、60 天取土样测定土壤中有有效磷含量。

(2) 对有植被盐渍土壤磷素转化效果

将盐碱土混合少量氮钾肥,分装花盆。处理组施加 RPB03 菌剂,对照组(CK)添加等量水。处理 120 d 后,测试中华结缕草(*Zoysia sinica* Hance)生物量以及土壤中有有效磷含量。

1.2.5 菌株鉴定

将纯化的细菌菌株斜面提交上海生物工程有限公司,由其进行 16SrRNA 序列测定,将获得的序列输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的序列进行比较分析,利用 MEGA7 软件进行系统发育树的构建。

1.2.6 统计分析

采用 SPSS13.0 进行数据处理,组内数据比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

2 结果与分析

2.1 盐地碱蓬根际解磷微生物解析

2.1.1 盐地碱蓬根际土壤中溶磷微生物种类

从盐地碱蓬根际土壤中共分离 17 株溶磷菌,其中真菌 2 株,放线菌 2 株,细菌 13 株,其溶磷效果见表 1。依据溶磷菌对磷酸钙的溶解能力,发现 RPB03 在生长繁殖及溶磷能力方面,效果比较优良,故对其进行了进一步研究。

2.1.2 菌株 RPB03 溶磷动力学

为了更准确地测试 RPB03 菌株的溶磷能力,对该菌株进行了动力学研究(图 1)。随培养时间延长,培养液中可溶性磷含量呈现先升高后降低再升高的趋势,而菌体细胞量基本呈现持续升高的趋势。在测试 0—2d 内,菌体的生长与溶液中可溶性磷含量趋势保持一致,皆呈现上升趋势,在培养第 2 天有效磷含量达到最大,为 318.45 mg/L;在此之后至第 4 天,随着菌体细胞呈现持续生长趋势,其可溶性磷含量持续下降,至第 5 天时降至最低,为 60.11 mg/L;与此同时,菌体的生长也有所减缓;第 6 天可溶性磷含量有所提高,而菌体细胞生长量也达到最大量。根据动力学曲线,可将该菌的溶磷能力测试时间设置为 48h。在 0—48h 之间,其磷素转化

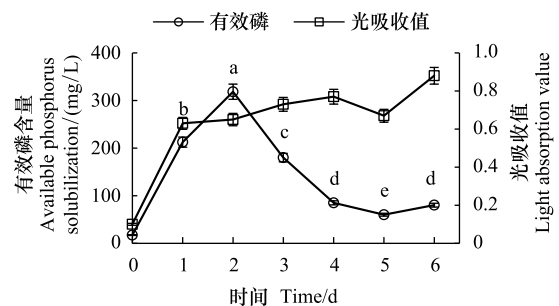


图 1 RPB03 菌株溶磷动力学曲线

Fig.1 The dissolved phosphorus kinetic curve of strain RPB03

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理时间内溶磷能力差异显著($P < 0.05$)

能力与微生物细胞生物量之间相关性很大,其相关系数 R 值为 0.9486。但随着 RPB03 菌株生物量的增大,其溶液磷含量与菌体量之间却呈现出负相关性,可见随着微生物生物量的增加,细胞对溶液中可溶性磷的溶解作用大于吸收作用,随着微生物菌体数量的不断增加,对磷素的需求急速提升,从而造成后期溶液磷素含量的下降。

表 1 碱蓬根际溶磷微生物
Table 1 PSM in the rhizosphere soil of *Suaeda salsa*

菌株编号 Bacterial number	种类 Type	菌落形态 Colony form	菌落直径 Colony diameter/mm	溶磷圈 Phosphate solubilization circle/mm	溶磷系数 Phosphate solubilization index	溶磷量 Phosphate solubilization capacity/(mg/L)
RPB01	细菌	湿润,边缘光滑,乳白色,较扁平	2.91	9.1	3.13	289.23
RPF02	放线菌	菌落初始白色,后期为绿色,表面有粉状物	2.11	6.5	3.10	274.54
RPF01	真菌	菌丝发达,边缘白色,老化菌丝表面呈明显轮纹,有黑色颗粒状子实体	28.5	36.1	1.27	335.89
RPF03	真菌	表面有黑色状子实体,菌落边缘无白色菌丝,无轮纹	18.5	24.5	1.32	234.62
RPB02	细菌	菌落极其微小,透亮,湿润,乳白色,高隆	0.91	3.1	3.44	128.74
RPB03	细菌	圆形,淡黄色,隆起,边缘光滑	2.22	6.9	3.14	302.86
RPB08	细菌	菌落较大,圆形,扁平,	9.94	10.01	1.01	147.39
RPB09	细菌	圆形,乳色,不透亮,较湿润	5.82	11.2	1.93	184.39
RPB10	细菌	菌落较小,圆形,高隆,透亮	2.44	6.9	2.88	257.13
RPB07	细菌	圆形,稍透亮,隆起	0.67	3.3	5.5	211.48
RPB11	细菌	乳白色,不透明,圆形,边缘光滑,凸起	5.93	13.5	2.29	109.97
RPB12	细菌	乳白色,表面扁平,有脐凸	3.95	11.1	2.84	299.28
RPB13	细菌	菌落较大,凸起,边缘透明	10.50	14	1.33	134.62
RPB14	细菌	透亮,凸起,乳色,圆形	3.07	6.1	2.03	243.17
RPB15	细菌	菌落较大,透亮,圆形,乳色	7.02	16.5	2.36	288.73
RPB16	细菌	圆形,边缘光滑,高凸,乳色,暗	5.51	13.5	2.45	278.45
RPF04	放线菌	灰绿色,表面有散粉	10.09	15.1	1.51	102.27

2.2 密闭培养条件下,不同环境因子对 RPB03 菌株溶磷能力的影响

2.2.1 不同酸碱度对 RPB03 菌株磷素转化效果

随溶液初始 pH 值的升高,RPB03 菌株溶磷能力不断下降,当 $\text{pH}>8$ 条件下溶磷效果存在显著差异(图 2)。pH6—8 范围内其溶磷能力无差异,皆超过 430 mg/L,初始 pH6 时 RPB03 溶磷效果最好,达到 450.57 mg/L。当 pH 提高到 9 时,其溶磷能力有所降低,下降至 385.19 mg/L,当 pH 提高至 10 时,仍然具有一定的溶磷能力(175.13 mg/L)。可见,该菌株从微酸性至碱性的范围内皆有溶磷能力,并且在较强的碱性环境条件下,仍然可以通过调节环境酸碱度进行磷的转化。黄河三角洲土壤呈弱碱性^[1-2],pH 值在 8 左右,从实验数据推测,该菌能够很好的适应该地区的土壤碱度。

培养 48h 后,各处理溶液 pH 值皆低于 7,甚至处处

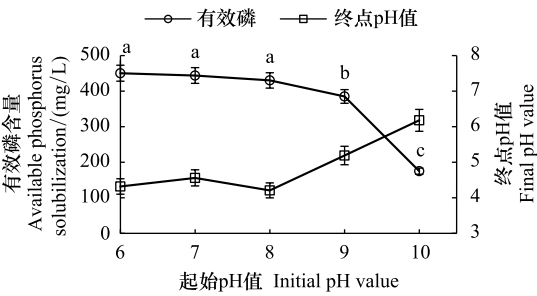


图 2 不同 pH 值对 RPB03 菌株溶磷能力的影响

Fig.2 Effect on the soluble phosphorus ability of RPB03 strain under different pH value

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间溶磷能力差异显著 ($P<0.05$)

理组(pH=8)低至4.21。溶磷能力与终点pH值相关系数 R 值为-0.9508。

2.2.2 不同温度条件下对 RPB03 菌株磷素转化影响

温度是影响微生物生长繁殖及新陈代谢的一个重要因子。不同温度条件下 RPB03 溶磷效果存在显著差异(图3),温度为35℃时,有效磷含量达到最高,为446.70 mg/L,其次是30℃。温度降低至10℃时,有效磷含量仅为52.57 mg/L,可能是低温限制了细菌正常的生长繁殖,导致溶磷效果较差;当温度高达45℃时,其具有相对较高的溶磷能力(有效磷含量为119.52 mg/L)。野外地面温度一般不超过45℃,推测该菌施入土壤后,能够适应其温度的变化范围。培养48h后,各处理溶液pH值与溶磷能力之间仍然存在显著的负相关性,相关系数 R 值为-0.9718。

2.2.3 不同转速对 RPB03 菌株磷素转化效果

不同的转速条件下,培养液中的溶氧量不同,转速越高,培养液中溶氧量越高。随着摇床转速的提高,RPB03 菌株溶磷能力有所提高(图4),当转速高于170 rpm/min时,其培养液中有效磷含量明显高于较低转速的含量。总体来看,具有较低终点pH值的处理组其有效磷含量也相对较高,但其溶磷能力与终点pH值相关性较差,其相关系数 R 值为-0.2640,如50 rpm/min处理组,其终点pH值为5.2,低于170 rpm/min处理组,但其磷素转化能力仅为168.93 mg/L。推测 RPB03 菌株在较低的溶解氧条件下,菌细胞生长缓慢,也可能由于氧含量较低导致细菌代谢方面发生了变化,进而影响其酸溶磷素的能力。很多研究结果表明,溶磷菌溶磷能力与产酸能力并不呈现显著的相关性,与本实验结果一致的。

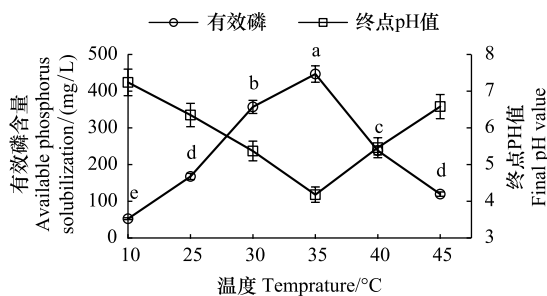


图3 不同温度对 RPB03 溶磷能力的影响

Fig.3 Effect of PRB03 strain on the soluble phosphorus ability at different temperature

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间溶磷能力差异显著 ($P<0.05$)

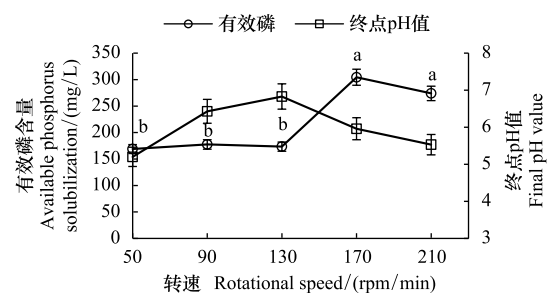


图4 不同转速对 RPB03 菌株溶磷能力的影响

Fig.4 Effect of PRB03 strain on the soluble phosphorus ability at different rotational speed

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间溶磷能力差异显著 ($P<0.05$)

2.2.4 不同盐度对 RPB03 菌株磷素转化效果

不同 NaCl 盐度条件下,RPB03 菌株溶磷能力存在显著差异(图5)。随盐度增加,溶磷能力呈下降趋势,但在5%盐度下,RPB03 菌株溶磷能力呈现一个跳跃的高峰,与无盐条件下磷素转化能力相比较,两者未达到差异显著水平。为什么在盐度5%条件下再次出现峰值呢?笔者认为,微生物对盐度的耐受能力可能存在于一个敏感范围,5%的盐度范围可能正好是处于该菌的盐度敏感区间,在敏感盐度范围内,有可能激活微生物某些基因的表达来适应环境。但具体原因究竟如何,还需要进一步的研究。终点pH值结果显示,这两个处理组终点pH值也较低。溶磷能力与终点pH值相关分析呈现显著负相关,其相关系数 R 为0.8890,推测该菌溶磷能力可能与细菌释放的酸性物质有关。

2.2.5 不同碳源及氮源对 RPB03 菌株磷素转化效果

碳源和氮源是微生物生长所需的两种必需元素。碳源及氮源的种类及比例不同,不仅影响到微生物细胞的生长与繁殖,对其代谢产物也会产生很大的影响。

RPB03 菌株对所试的五种碳源的利用能力不同,其溶磷效果存在显著差异(图6)。葡萄糖作唯一碳源时

溶磷效果最好,达到 500.87 mg/L,其次是蔗糖,乳糖作唯一碳源时效果最差。不同碳源溶磷能力与终点 pH 相关性不是太大,以乳糖作唯一碳源时,其终点 pH 值比可溶性淀粉要低,但是其溶磷能力仅为其可溶性淀粉的 79.24%,呈现显著差异。而溶磷效果最好的终点 pH 值 6.82,呈微酸性,明显高于乳糖为碳源的 pH 值 (5.16)。可见,RPB03 菌株在利用不同碳源时,溶磷效果、代谢途径会发生变化,导致其溶磷能力出现差异,而酸溶磷可能不是 RPB03 菌株降解矿物质磷素的唯一途径。溶磷能力与终点 pH 值相关系数 R 值为 0.5308。

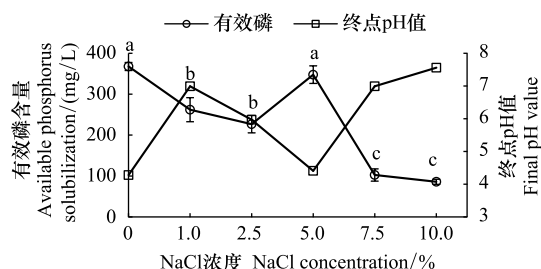


图5 不同 NaCl 浓度对菌株 RPB03 溶磷能力的影响

Fig.5 The effect of RPB03 strain on soluble phosphorus ability under different NaCl concentration

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间溶磷能力差异显著 ($P < 0.05$)

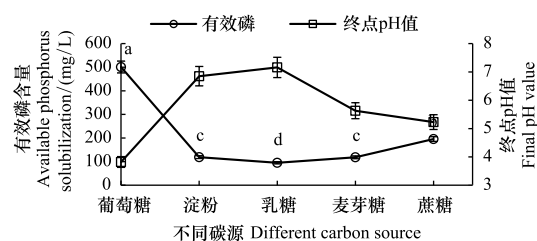


图6 不同碳源条件下 RPB03 菌株溶磷能力

Fig.6 Soluble phosphorus ability of RPB03 strain at different carbon source

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间溶磷能力差异显著 ($P < 0.05$)

利用不同氮源时 RPB03 菌株溶磷效果亦存在显著差异(图7)。其溶磷效果为 $\text{KNO}_3 > \text{NH}_4\text{NO}_3 > (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 > \text{NH}_4\text{Cl} > \text{urea}$ 。从氮源形态来看,硝态氮优于铵态氮,尿素效果最差。溶磷能力与终点 pH 值相关性不高,其相关系数 R 值为 -0.6287。

2.3 RPB03 菌株对黄河三角洲盐碱土壤磷素转化效果

2.3.1 RPB03 菌株对裸斑盐渍土壤的溶磷效果

为了研究该菌株对裸斑盐碱地土壤的磷素转化效果,设置了灭菌土壤和非灭菌土壤两个处理实验。从实验结果来看,投加 RPB03 菌剂后,有效磷含量明显提高,磷素转化效果显著(图8)。灭菌土壤处理组和未灭菌处理组有效磷含量由最初 0.029 mg/kg 分别提升至 0.041 mg/kg 和 0.043 mg/kg。从实验结果我们还发现,黄河三角洲盐渍土壤中的其他微生物类群与 RPB03 菌株具有潜在的协同效应,但协同效果不显著。

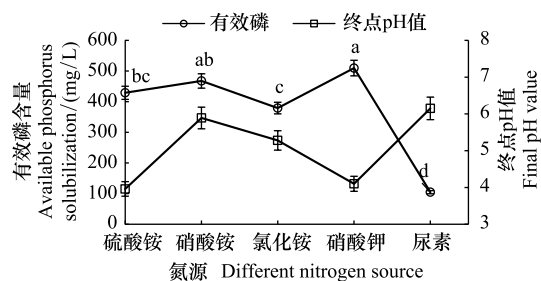


图7 不同氮源下 RPB03 菌株的溶磷能力

Fig.7 Soluble phosphorus ability of RPB03 strain at different nitrogen source

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间差异显著 ($P < 0.05$)

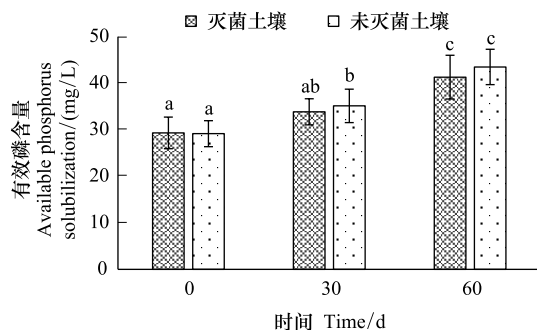


图8 RPB03 菌株对无植被土壤的溶磷效果

Fig.8 The effect of PRB03 strain on the phosphorus solubilization in soil without vegetation

不同小写字母表示溶磷菌株在不同处理组间溶磷能力差异显著 ($P < 0.05$)

2.3.2 植被存在条件下溶磷菌 RPB03 对盐渍土壤的溶磷效果

为了进一步验证该菌株在植被存在条件下对土壤肥力的提升效果,选取了中华结缕草,进行了盆栽实验(表2)。中华结缕草是黄河三角洲地区常见的草坪草种,耐践踏,适应性强。从表中可以看出,两个处理组土壤有效磷含量都有所提高,但提高程度不同,施加菌剂处理组显著高于对照组。虽然对照组没有投加溶磷细菌,但土壤本身存在溶磷微生物。在植物生长过程中,由于根际分泌代谢物质,土壤溶磷细菌会在根际圈内富集,从而在一定程度上提高了土壤有效磷含量,但其提高程度不如处理组。可见,该菌在植被存在条件下,同样能够有效转化土壤中的无效磷,提高土壤有效磷含量。

投加 RPB03 菌株处理组,不仅能够提高土壤有效磷含量,也能够促进中华结缕草的生长。其平均株高可达 29.47 cm,与对照组相比差异显著。宇万太等^[7]在潮棕壤上连续进行 18 年的定位试验,发现单使磷肥对玉米秸秆增加并不显著,与本实验结果相反。除了实验材料的差异外,两者的实验土壤截然相反。本实验土壤采自黄河三角洲非耕地盐渍土壤,土壤贫瘠,有效磷含量极低,这可能是对照组植物生长不良的主要原因之一。而宇万太等研究者采用的是农田耕地,土壤中有效磷含量本底水平高,且磷库源充足,磷素对植物生长的影响较小。姜焕焕^[7]也发现,解磷菌可提高盐碱地土壤酶活性与土壤微生物数量,尤其可促进参与土壤营养元素的微生物种类的富集,全面改善盐碱土性质,促进了植株的生长。

表 2 溶磷菌 RPB03 对中华结缕草株高、干重及土壤磷含量的影响

Table 2 The effects of phosphate-solubilizing bacterium RPB03 on the plant height, dry weight of *Zoysia sinica* Hance and soil phosphorus content

处理组 Treatment	株高 Plant height/cm	植株干重 Plant dry weight/g	根干重 Dry weight of root/g	有效磷含量 Available phosphorus content/(mg/kg)
CK	17.52±3.80	160.73±3.02	16.79±2.89	31.18±3.45
RPB03	29.47±2.81 **	337.34±2.93 **	24.82±2.78 *	39.59±2.35 *

* 表示 $P<0.05$ 水平差异显著, ** 表示 $P<0.01$ 水平差异极显著

2.4 RPB03 菌株的鉴定

经 PCR 扩增后菌株 RPB03 的 16SrRNA 序列全长为 1397bp, GenBank 登录号为 MH247129, BLAST 分析结果显示该序列与泛菌属(*Pantoea* sp.)的 16SrRNA 序列同源性最高,其中与菌株 *Pantoea vagans* (CP014129) 有较高的同源性,相似度均为 100%,其他菌株的相似性达到 99%(图 9)。综上,确定菌株 RPB03 隶属泛菌属。

3 讨论

3.1 根际溶磷细菌的溶磷效果及机理

研究表明,土壤溶磷微生物多数通过分泌酸性物质分解土壤中不溶性磷素,也有相当一部分溶磷微生物通过胞外酶来分解环境中的有机磷,例如分泌碱性磷酸酶。Khadija Ayyaz 从小麦根际分离到五株具有溶磷特性的固氮螺旋菌(*Azospirillum* sp.)^[18],可向生境中分泌醋酸、柠檬酸、乳酸、苹果酸及琥珀酸等有机酸促进磷素的有效转化。本试验菌株 RPB03 在溶磷能力研究过程中,亦发现其溶磷效果与溶液的 pH 值之间呈负相关,推测该菌株溶磷机理可能通过分泌酸性物质促进了磷酸钙的降解,但其酸性物质的种类还需要进一步研究。

据报道,溶磷菌不仅能够有效提高土壤有效磷含量,对植物的生长发育、抗病性等方面皆具有积极的意义^[19-20]。已报道的溶磷菌 *Bacillus megaterium*^[21]、*Achromobacter xylosoxidans* (JCp4)^[22]、*Ochrobactrum* sp.^[22]、*Pseudomonas* sp.^[13] 等多个属种的微生物都能够有效促进植物的生长。其促生机理主要表现在能够分泌植物生长素 IAA(indole acetic acid)。本实验菌株 RPB03 在中华结缕草株高、干重等方面都具有促进作用,与对照相比差异显著,但该菌株是否通过分泌植物生长素促进了植物的生长并未研究。

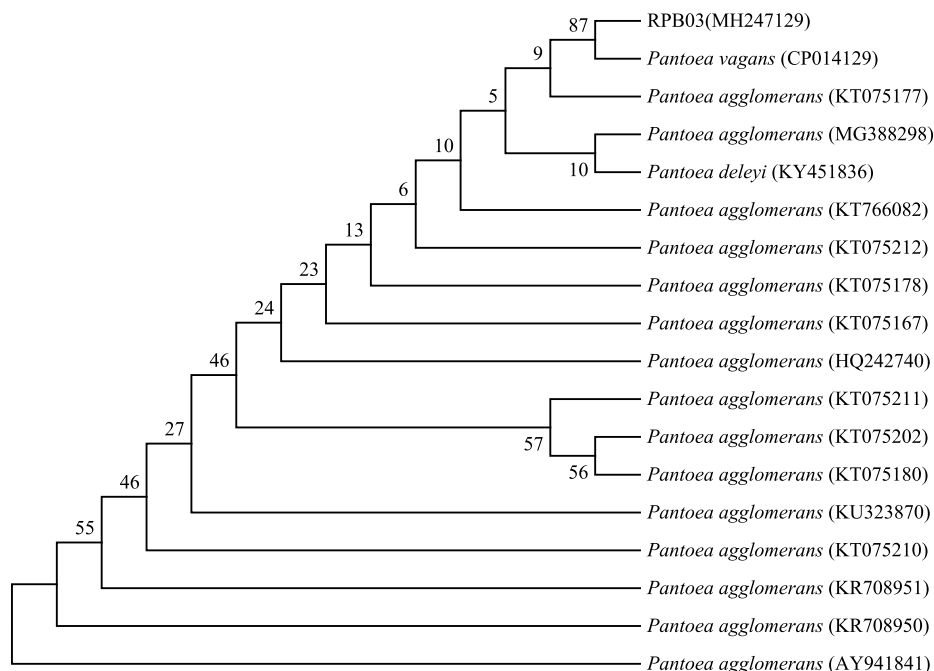


图9 RPB03 菌株系统发育树

Fig.9 Polymeric analysis of strain RPB03

RPB03 菌株分离自碱蓬根际, Blast 比对结果显示隶属泛菌属 (*Pantoea*)。已有研究报道该属对植物生长、抗病性方面具有良好的效果^[23-24]。张丽珍自柠条植物体内分离到一株内生泛菌, 与本研究菌株皆为 *Pantoea vagans*^[25], 但其溶磷能力却相差甚远, 仅为 4.45 mg/L。该菌株在柠条和碱蓬的生存环境完全不同, 这可能是两者解磷能力的差异主要原因。Son^[26]、Chung^[27] 等学者也分别从大豆根际和农作物根际分离到溶磷泛菌, 其溶磷能力分别为 900 mg/L 和 113.7 mg/L。可见泛菌属细菌广泛存在于多种植物根际, 是构成根际微生物的主要类群之一。从已有的研究不难发现, 不同植物根际分离的泛菌, 其溶磷能力差异较大, 分析其原因, 可能跟泛菌所处的生态环境及植物根系的代谢产物有关。本研究结果也证实了不同的因子、土壤植被情况对 RPB03 菌株的溶磷能力影响较大。当然, 室内实验条件与自然生境存在很大差异。本研究结果也只是模拟部分因子, 采用了单因素实验, 其结果与在自然条件下该菌株的解磷能力相比较, 究竟存在何种差异, 还需要进一步探讨。

3.2 溶磷细菌对土壤肥力提升效果

黄河三角洲是由黄河携带大量泥沙在入海口淤积而成的新生陆地, 受河流和海洋等多种动力交互作用, 该地区潜水埋深浅、矿化度高, 导致土壤盐渍化较重、范围广, 成为限制黄河三角洲土地生产力的主要因素之一^[28]。目前, 我国对盐渍土的改良多采用物理及生物手段^[29-30], 利用微生物制剂改良盐碱地的实践研究仍然相对滞后。在黄河三角洲地区, 常采用不同植被模式^[28]、灌水降盐^[31]及生物改良剂^[32]等措施, 其主要目的是降低土壤中的盐分含量。对于利用解磷微生物提升土壤肥力的研究还相对薄弱, 多停留在解磷微生物的一些基础性研究^[9-10]。姜焕焕自黄河三角洲分离到一株解磷菌 *Providencia rettgeri*^[8], 利用该菌与磷石膏联合施用对盐碱土进行了改良, 发现对土壤有效磷提升量增加了 19.57 mg/kg。李学平等自滨海盐碱地某蔬菜根际分离到一株高效解磷真菌, 对小麦具有显著的促生长效果^[9]。Singh 等对溶磷真菌也进了部分研究, 能够显著提高小麦和玉米产量^[33]。本研究筛选的溶磷菌 RPB03 菌株, 得到了类似的结果, 对土壤有效磷提升量增加了 14.33 mg/kg, 实验植物的株高及植物干重增加显著, 具有促进植物生长的效果。当然, 在自然环境条件下, 该溶磷细菌提升盐渍土壤肥力效果、机理及措施还需进一步研究。

4 结论

通过研究酸碱度、温度、盐度(NaCl)、转速(充氧量)、氮源及碳源等环境因子对 RPB03 菌株溶磷能力影响,表明该菌溶磷能力显著,在较高的酸碱度、盐度及较高的温度下,依然表现了良好的溶磷能力,在黄河三角洲盐渍土壤生境中具有潜在的适应性;同时,该菌能够显著提高测试土壤的有效磷含量,从对黄河三角洲盐碱地肥力提升方面来看,具有良好的开发前景。

参考文献(References):

- [1] 陈印平,夏江宝,赵西梅,诸葛玉平. 黄河三角洲典型人工林土壤碳氮磷化学计量特征. 土壤通报, 2017, 48(2): 392-398.
- [2] 夏江宝,陈印平,王贵霞,任加云. 黄河三角洲盐碱地不同造林模式下的土壤碳氮分布特征. 生态学报, 2015, 35(14): 4633-4641.
- [3] 刘晓玲,王光美,于君宝,冉越男,管博,韩广轩,王安东,赵亚杰. 氮磷供应条件对黄河三角洲滨海湿地植物群落结构的影响. 生态学杂志, 2018, 37(3): 801-809.
- [4] 靖淑慧,刘加珍,陈永金,张天举. 滨海湿地不同群落对土壤磷的有效性影响研究. 土壤通报, 2018, 49(2): 392-401.
- [5] Kibrom F G, Alemayehu W, Prakasam V R, Kiros W. Isolation and characterization of efficient phosphate solubilizing *Bacillus* (PSB) from different agro-ecological zones of Tigray soil, Ethiopia. Momona Ethiopian Journal of Science, 2017, 9(2): 262-273.
- [6] 于子博,庄涛,白军红,余璐,王伟,张树岩. 黄河三角洲潮间带盐地碱蓬湿地土壤磷含量和储量的季节动态变化特征. 农业环境科学学报, 2019, 38(3): 633-640.
- [7] 宇万太,姜子绍,马强,周桦. 不同施肥制度对作物产量及土壤磷素肥力的影响. 中国生态农业学报, 2009, 17(5): 885-889.
- [8] 姜焕焕. 耐盐碱解磷菌与磷石膏联用改良盐碱土的效果与机制[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2019.
- [9] 李学平,谢文军,范延辉. 盐碱地塔宾曲霉菌的解磷能力及其对小麦生长的影响. 水土保持通报, 2017, 37(1): 93-96.
- [10] 范延辉,王君,刘雪红,张丽燕,李小彬. 一株耐盐解磷真菌的筛选、鉴定及其发酵优化. 土壤通报, 2015, 46(2): 362-367.
- [11] De La Torre-Ruiz N, Ruiz-Valdiviezo V M, Rincón-Molina C I, Rodríguez-Mendiola M, Arias-Castro C, Gutiérrez-Miceli F A, Palomeque-Dominguez H, Rincón-Rosales R. Effect of plant growth-promoting bacteria on the growth and fructan production of *Agave americana*. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(3): 587-596.
- [12] Zahir Z A, Arshad M, Frankenberger W T. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. Advances in Agronomy, 2003, 81: 97-168.
- [13] Kumari S, Vaishnav A, Jain S, Varma A, Choudhary D K. Bacterial-mediated induction of systemic tolerance to salinity with expression of stress alleviating enzymes in Soybean (*Glycine max* L. Merrill). Journal of Plant Growth Regulation, 2015, 34(3): 558-573.
- [14] 吕睿,贾凤安,刘晨,胡婷,甄丽莎. 无机磷降解菌株的分离、鉴定及解磷能力. 江苏农业科学, 2017, 45(20): 295-298.
- [15] Vazquez P, Holguin G, Puente M E, Lopez-Cortes A, Bashan Y. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. Biology and Fertility of Soils, 2000, 30(5): 460-468.
- [16] 陆洪省,王亚舒,王厚伟,赵晓舒. 盐碱地中解磷菌的分离鉴定及其解磷能力研究. 东北农业大学学报, 2014, 45(2): 77-82.
- [17] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法(第四版). 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- [18] Ayyaz K, Zaheer A, Rasul G, Mirza M S. Isolation and identification by 16S rRNA sequence analysis of plant growth-promoting azospirilla from the rhizosphere of wheat. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(3): 542-550.
- [19] Mahanta D, Rai R K, Dhar S, Varghese E, Raja A, Purakayastha T J. Modification of root properties with phosphate solubilizing bacteria and arbuscular mycorrhiza to reduce rock phosphate application in soybean-wheat cropping system. Ecological Engineering, 2018, 111: 31-43.
- [20] Bashan Y, de-Bashan L E. Bacteria/plant growth-promotion//Hillel D, ed. Encyclopedia of Soils in the Environment, Vol 1. Oxford, UK: Elsevier; 2005: 103-115.
- [21] Joe M M, Devaraj S, Benson A, Sa T M. Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2016, 3(2): 71-77.
- [22] Akbar S, Sultan S. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifos degradation and plant growth enhancement. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(3): 563-570.
- [23] 张晓宇,高振峰,张宝俊,王亮,赵迎丽,张立新. 生防菌成团泛菌 XM2 抗菌蛋白抗真菌特性研究. 河南农业大学学报, 2017, 51(5): 693-698.
- [24] 周小梅,赵运林,董萌,库文珍,梁曾恩妮. 成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)对镉胁迫下菱蒿耐受性的影响. 生态毒理学报, 2016, 11

- (4): 176-183.
- [25] 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.
- [26] Son H J, Park G T, Cha M S, Heo M S. Solubilization of insoluble inorganic phosphates by a novel salt-and pH-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere. Bioresource Technology, 2006, 97(2): 204-210.
- [27] Chung H Y, Park M, Madhaiyan M, Seshadri S, Song J, Cho H, Sa T M. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 10(37): 1970-1974.
- [28] 孙佳, 夏江宝, 苏丽, 赵西梅, 陈印平, 岳喜元, 李传荣. 黄河三角洲盐碱地不同植被模式的土壤改良效应. 应用生态学报, 2020, 31(4): 1323-1332..
- [29] 卢培娜, 刘景辉, 张丰屹. 不同改良措施对盐碱地燕麦形态生理及产量的影响. 中国农学通报, 2018, 34(15): 20-25.
- [30] 何瑞成, 吴景贵. 有机物料对原生盐碱地土壤生物学性质的影响. 土壤学报, 2018, 55(3): 774-782.
- [31] 胡琴, 陈为峰, 宋希亮, 孙若钧, 罗延峰. 不同灌水量对黄河三角洲盐碱地改良效果研究. 水土保持学报, 2019, 33(6): 305-310, 325-325.
- [32] 李旭霖, 刘庆花, 柳新伟, 胡景田, 杨聚才, 崔德杰. 不同改良剂对滨海盐碱地的改良效果. 水土保持通报, 2015, 35(2): 219-224.
- [33] Singh H, Reddy M S. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils. European Journal of Soil Biology, 2011, 47(1): 30-34.