

文章编号:1003-8701(2011)01-0013-04

高效溶磷微生物菌株的筛选、鉴定及其对磷素效率的影响

金荣德¹, 范作伟¹, 高星爱¹, 张爱平², 吴海燕^{1*}

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林省白山市农业技术推广站, 吉林 白山 134300)

摘要:从我省中部地区种植玉米的贫磷土壤样品进行分离筛选获得了综合能力较强的细菌 24 株; 通过 DNA 测序和 16S rRNA 系统发育分析, 分别鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* strain Q1)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strain AR-10)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、伯克金氏菌(*Burkholderia* sp. CEB01056)、*Oxalobacteraceae* bacterium NR186 和肠杆菌(*Enterobacter ludwigii* strain K9); 田间试验结果表明: 溶磷发酵液与化肥配施的情况下, 磷肥用量减少 1/3 或 2/3 的处理与全量磷肥产量差异不显著, 各个处理与对照相比均表现明显的增产效应。

关键词: 溶磷细菌; 筛选; 鉴定; 磷素效率

中图分类号: S154

文献标识码: A

Isolation and Identification of Phosphate Solubilizing Microorganisms and Their Effect on Utilization of Phosphorus

JIN Rong-de¹, FAN Zuo-wei¹, GAO Xing-ai¹, ZHANG Ai-ping², WU Hai-yan^{1*}

(1. Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033;

2. Baishan Agricultural Technology Extension Station, BaiShan 134300, China)

Abstract: Twenty-four strains of lytic-enzymes producing bacteria were isolated from the phosphate-lacked soil in the middle of Jilin province. Among them, seven strains which have strongest phosphate-solubilizing activities were identified as *Bacillus subtilis* strain Q1, *Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strain AR-10, *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1, *Bacillus cereus*, *Burkholderia* sp. CEB01056, *Oxalobacteraceae* bacterium NR186 and *Enterobacter ludwigii* strain K9 according to 16s rRNA gene sequence. No significant yield reduction was found in the treatment which was amended with 33% and 66% phosphate fertilizer compared to full-amended treatment and all the three amendment showed significant increment in the yield compared to control.

Keywords: Isolation of PSB, identification of phosphate efficiency

磷素是作物生长发育所必需的营养元素之一, 土壤中能被植物吸收利用的有效态无机磷很低, 一般只占全磷量的 2% ~3%。由于土壤磷固定现象的存在, 致使土壤中磷含量虽然很高, 但可提供给植物生长发育的有效磷含量却很低。据统计,

我国有 74% 的土壤耕层全磷含量很高(0.4 ~ 2.5 g/kg), 但土壤中 95% 以上的磷为无效磷^[1]。解磷微生物 (phosphate-soluble microorganisms, PSMs) 是土壤中能将难溶性磷转化为植物能够吸收利用的可溶性磷的一类特殊的微生物功能类群, 包括解磷细菌、解磷真菌和解磷放线菌^[2-7]。解磷微生物肥料具有成本低、效果好、增强植物抗病能力、不污染环境、充分利用潜在磷素资源等优点。其不仅能改善植物磷素营养, 还能促进土壤中有益微生物的代谢活动, 显著改善植物根部营养,

收稿日期: 2010-12-24

基金项目: 吉林省科技厅重点项目(20080254)

作者简介: 金荣德(1976-), 男, 博士, 主要从事微生物肥料研究。

通讯作者: 吴海燕, 女, 研究员, E-mail: wuhaiyan1968@163.com

达到增产效果。利用微生物来提高土壤固定态磷的利用率,无疑是行之有效的方法。

因此,针对有效磷缺乏、土壤潜在磷源丰富的现状,筛选高效解磷微生物,研制解磷微生物肥料并应用于农业生产,充分利用土壤潜在磷源,这对于缓解磷资源短缺、减少环境污染、发展持续高效农业具有深远的战略意义,也是国内外土壤肥料及植物营养学界研究的热点之一^[8]。

1 材料与方 法

1.1 土壤样本的采集

采集我省中部地区种植玉米的土壤样品放入塑料袋中,封口,置于4℃的冰箱保存。

1.2 溶磷微生物菌株的分离及筛选

用平板稀释分离法(溶磷菌筛选培养基:葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 0.3 g, FeSO₄·7H₂O 0.03 g, MnSO₄·4H₂O 0.03 g, Ca₃(PO₄)₂ 10.0 g, 琼脂粉 15 g, pH 值 7.0~7.2, 水 1 000 mL。

1.3 菌株的鉴定

DNA 序列测定:将菌株接种在 TSB 中, 28℃ 震荡培养 18 h, 取菌液 1 mL 在 4 000 rpm 离心 5 min, 除去上清液, 利用 DNA 抽提试剂提取细菌 DNA。

16S rDNA 序列扩增:提取的细菌 DNA 与 1 双 primers(引物)(Y1, 5'-tggtcagaacgaacgctggcg-gc-3' Y2, 5'-cccactgctgctcccgtaggag t-3') 利用 polymerase chain reaction(PCR)方法来扩增细菌。Y1, Y2 为相应 E. coli 16S rRNA gene 的 20-43bp 和 361-338bp 的序列, 与大部分细菌的 16s rRNA gene 非常相似。将扩增的 DNA 络合于 TA cloning vector(质粒载体)后转接到 E. coli。随后将纯化菌株的菌群接种在 LB 中, 28℃ 震荡培养以获取大量的质体。纯化的质体用 automatic DNA sequencing machine 来进行测序。将测序所得 16SrDNA 的互补 DNA 序列, 与 GenBank 数据库中的已知核酸序列进行 Blast 分析, 调出与该序列相关性较高的核酸序列, 采用 DNAs2tar 软件的 Multiple Sequence Alignment 程序进行多序列比对和系统发育树构建。

1.4 菌株的溶磷能力、产生明胶酶、蛋白酶以及纤维素酶能力的测定

以磷酸钙、水溶性明胶、脱脂乳、CMC 为唯一磷源, 对分离筛选的菌株进行测定。根据各个菌株形成的透明圈大小判断菌株的溶磷能力、产生明

胶酶、蛋白酶以及纤维素酶能力(数字 3 表示很强、数字 2 表示强、数字 1 表示一般、数字 0 表示无活性)。

1.5 溶磷菌发酵液的制备

将斜面菌种接入已灭菌的磷细菌基础培养中, 28℃ 振荡培养 18 h 制备一级种子原液, 然后将微生物原液加入发酵培养中进行发酵, 培养 96 h 后即成为磷细菌发酵液, 备用。

1.6 溶磷菌发酵液在玉米上的施用效果及其对磷素效率的影响

1.6.1 试验设计

试验地点:公主岭市龙山乡翻身村。

供试作物:玉米品种吉单 260, 密度为 5.05 万株/hm²。

试验设置:田间试验设置 5 个处理 3 次重复, 6 行区, 小区面积 30 m², 具体设置为:①微生物肥料(地灌)+NK+1/3P; ②微生物肥料(地灌)+NK+2/3P; ③微生物肥料(地灌)+NK+P; ④微生物肥料(地灌)+NK(测定菌液对土壤难溶性磷的作用); ⑤NK (CK)(测定土壤供磷能力)。肥料施用量按 N240 kg/hm²、P₂O₅ 120 kg/hm²、K₂O 120 kg/hm², 选用单质肥料为尿素(N46%)、磷酸二铵(N18%、P₂O₅ 46%)和氯化钾(K₂O 60%), 施肥日期为 2010 年 4 月 15 日, 播种日期为 5 月 1 日。

1.6.2 试验方法

分别在玉米苗期(6 月 1 日)、拔节期(6 月 30 日)和吐丝期(7 月 30 日)等关键生育期地面灌溉微生物液体肥料, 对照以清水代替。并于播种前和收获后采取 0~20 cm 土壤样品及其相对应植株以备测定使用。

2 结果与分析

2.1 高效溶磷微生物菌株的筛选及鉴定

2.1.1 菌株的筛选

从我省中部地区采取种植玉米的土壤样品, 用稀释平板分离法, 在无菌操作条件下取土样 1 g, 用无菌水以 10 倍梯度稀释成 10⁻³~10⁻⁶ 稀释液, 取稀释液 0.1 mL 涂布基础培养基平板, 28℃ 培养, 分离筛选到功能菌株 24 株(表 1)。

2.1.2 菌株溶磷能力的测定

以磷酸钙为唯一磷源, 对分离筛选的菌株进行溶磷能力测定。结果表明, 分离获得的 58.3% 的菌株具有较强的综合能力(图 1), 其中溶磷能力最强的是来源于黑土的 14 号和 24 号菌株, 其次是来源于黑土的 15、16、17、18 号菌株和来源于黑

钙土 22 号菌株(表 1)。以磷酸钙为磷源上形成的溶磷圈说明筛选的菌株具有较强的溶磷效果(图

2)。总体趋势是长期不施磷肥的土壤中溶磷菌的活性较强。

表 1 菌株的分离、筛选、鉴定及溶磷、产生明胶酶、蛋白酶以及纤维素酶能力的测定结果

| 菌株序号 | 采样地点 | 土样类型 | 几丁质酶 | PSM | 纤维素酶 | 蛋白酶 | 明胶酶 | 鉴定结果 | 备注 |
|------|----------|------|------|-----|------|-----|-----|--|------------|
| 1 | 公主岭龙山乡 | 薄层黑土 | 0 | 0 | 2 | 2 | 2 | | 玉米 |
| 2 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 3 | 0 | 0 | 1 | 3 | | 草地 |
| 3 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 玉米 |
| 4 | 公主岭龙山乡 | 薄层黑土 | 3 | 0 | 1 | 3 | 3 | Bacillus subtilis strain Q1 (枯草芽孢杆菌) | 玉米 |
| 5 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain AR-10 苏云金芽孢杆菌 | 玉米 |
| 6 | 乾安肥让字乡 | 黑钙土 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | | 玉米 |
| 7 | 公主岭龙山乡 | 薄层黑土 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | | 玉米 |
| 8 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 0 | 1 | 0 | 2 | 3 | | 玉米 |
| 9 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 玉米 |
| 10 | 公主岭龙山乡 | 薄层黑土 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | | 玉米 |
| 11 | 长春 | 黑土 | 3 | 0 | 0 | 3 | 2 | | 玉米 |
| 12 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 3 | 0 | 0 | 3 | 3 | Pseudomonas fluorescens Pf0-1 荧光假单胞菌 | 玉米单施 N 肥 |
| 13 | 公主岭龙山乡 | 薄层黑土 | 1 | 0 | 3 | 3 | 3 | Bacillus cereus (蜡状芽孢杆菌) | 玉米 (生产禁用菌) |
| 14 | 长春 | 黑土 | 0 | 3 | 0 | 2 | 2 | Burkholderia sp. CEB01056 (伯克氏菌) | 玉米 |
| 15 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 0 | 2 | 3 | 0 | 0 | | 玉米单施 K 肥 |
| 16 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | | 玉米单施 K 肥 |
| 17 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | 玉米单施 K 肥 |
| 18 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 0 | 2 | 3 | 1 | 0 | Oxalobacteraceae bacterium NR186 | 玉米单施 K 肥 |
| 19 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | | 玉米单施 K 肥 |
| 20 | 公主岭龙山乡 | 薄层黑土 | 0 | 0 | 0 | 3 | 2 | | 玉米 |
| 21 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | | 玉米 |
| 22 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | | 玉米深施有机肥 |
| 23 | 乾安县让字乡 | 黑钙土 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | | 玉米深施有机肥 |
| 24 | 农科院(公主岭) | 黑土 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | Enterobacter ludwigii strain K9(肠杆菌) | 玉米单施 N 肥 |

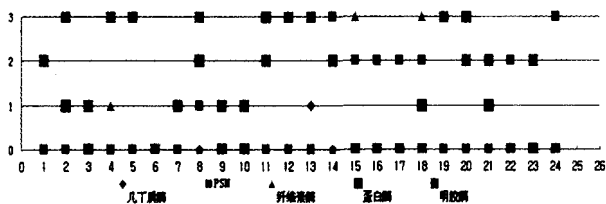


图 1 分离筛选的菌株溶磷、产生明胶酶、蛋白酶以及纤维素酶能力示意图

2.1.3 菌株的鉴定

分别对综合能力较强的 4、5、12、13、14、18

和 24 号菌株进行了 DNA 测序和 16S rRNA 系统发育树构建, 分别鉴定为枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis strain Q1)、苏云金芽孢杆菌(Bacillus thuringiensis serovar kurstaki strain AR-10)、荧光假单胞菌(Pseudomonas fluorescens Pf0-1)、蜡状芽孢杆菌(Bacillus cereus 生产禁用菌)、伯克氏菌(Burkholderia sp. CEB01056)、Oxalobacteraceae bacterium NR186 和肠杆菌(Enterobacter ludwigii strain K9)(表 1)。

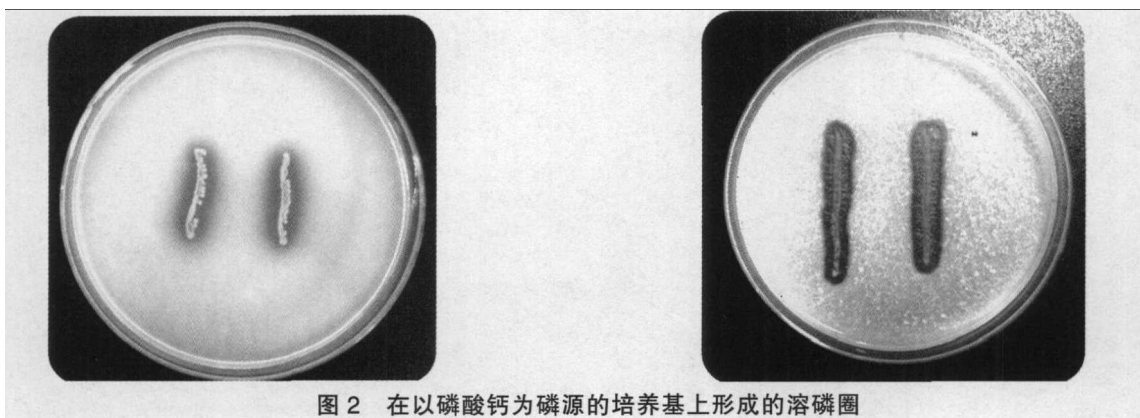


图 2 在以磷酸钙为磷源的培养基上形成的溶磷圈

2.2 溶磷菌发酵在玉米上的施用效果及其对磷素效率的影响

分别在吐丝期和收获期调查了玉米的株高、茎粗、叶面积等生物学性状及产量性状,结果列于表2。溶磷菌发酵液对玉米株高、茎粗和叶面积等生物学性状的影响结果表明,各个处理与对照(磷肥、菌液均不用)相比均有明显增加的趋势,但处理间差异不十分显著。从溶磷菌发酵液对玉米产

量性状的影响结果分析,穗长、穗粒数、百粒重以处理3(全量化肥与菌液配施)最高,处理1(磷肥减量2/3)和处理2(磷肥减量1/3)次之;从产量结果分析,全量磷肥的处理3显著高于不施磷肥的处理4(只施菌液不施磷肥)和处理5(CK),但与处理1和处理2相比差异不显著。说明在本试验条件下与溶磷菌发酵液配施,磷肥用量减少1/3或2/3的处理与全量磷肥产量差异不显著,各个处理与

表2 溶磷菌对玉米生物学性状及产量的影响

| 处理 | 株高(cm) | 茎粗(cm) | 叶面积(m ²) | 穗长(cm) | 穗粒数 | 出籽率(%) | 百粒重(g) | 病株或倒伏 | 干物质积累(kg/hm ²) | 产量(kg/hm ²)按密度 |
|-----|--------|--------|----------------------|--------|-------|--------|--------|-------|----------------------------|----------------------------|
| 处理1 | 300.3 | 2.40 | 0.7267 | 18.1 | 545.3 | 86.80 | 39.86 | 8.0 | 19474 | 9197bc(AB) |
| 处理2 | 297.0 | 2.31 | 0.7945 | 18.8 | 555.8 | 88.57 | 39.98 | 8.0 | 19732 | 9771ab(AB) |
| 处理3 | 294.5 | 2.39 | 0.7928 | 19.2 | 593.5 | 87.88 | 42.03 | 7.7 | 19850 | 9941a(A) |
| 处理4 | 288.8 | 2.36 | 0.7790 | 18.9 | 564.8 | 87.96 | 39.32 | 11.7 | 19317 | 9185bc(AB) |
| 处理5 | 282.9 | 2.25 | 0.6874 | 19.3 | 561.5 | 87.41 | 39.77 | 11.3 | 19022 | 8911c(B) |

注:以上数据为3次重复的平均数。

对照相比均表现明显的增产效应。

3 结论

筛选获得的菌株62.5%具有较强的溶磷能力,总体趋势是长期不施磷肥的土壤中溶磷菌的活性较强。

通过DNA测序和16S rRNA系统发育分析,将分离的菌株分别鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* strain Q1)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis* serovar *kurstaki* strain AR-10)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens* Pf0-1)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*生产禁用菌)、伯克氏菌(*Burkholderia* sp. CEB01056)、*Oxalobacteraceae* bacterium NR186和肠杆菌(*Enterobacter ludwigii* strain K9)。

在本试验条件下与溶磷菌发酵液配施,磷肥用量减少1/3或2/3的处理与全量磷肥产量差异不显著,各个处理与对照相比均表现明显的增产效应。

参考文献:

- [1] 徐俊兵. 扬州市土壤有机质和速效磷钾的分布研究[J]. 土壤, 2004, 36(1): 99-103.
- [2] 王光华, 赵英, 周德瑞, 等. 解磷微生物的研究现状与展望[J]. 生态环境, 2003, 12(1): 96-101.
- [3] 李卓棣, 胡正嘉. 微生物学(第五版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000, 228.
- [4] Rivas R, Peix A, Mateos P F, et al. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing Rhizobium nodulates chickpea in different Spanish soils[J]. Plant and Soil, 2006, 287(1-2): 23-33.
- [5] Son H J, Park G T, Cha M X, et al. Solubilization of insoluble inorganic phosphate by a novel salt and Ph-tolerant *Pantoea agglomerans* R-42 isolated from soybean rhizosphere[J]. J. Biosource Technol., 2006, 97(2): 204-210.
- [6] Sperber J I. Solution of mineral phosphates by soil bacteria[J]. Nature, 1957, 180(4593): 994-995.
- [7] Rao A V, Venkateswari B, Icaul P. Isolation of a phosphate-dissolving soil actinomycete[J]. Curr. Sci. (Bangalore), 1982, 51(23): 1117-1118.
- [8] 吴鹏飞, 张冬明, 郝丽虹, 等. 解磷微生物研究现状与展望[J]. 中国农业科技导报, 2008, 10(3): 40-46.