

广西喀斯特地区植物根际土壤解磷菌筛选及促生效应研究*

Screening of Phosphate Solubilizing Bacteria and Growth Promoting Effect in Rhizosphere Soil of Karst Area in Guangxi

张中峰^{1**},周龙武¹,徐广平¹,张金池²

ZHANG Zhongfeng¹,ZHOU Longwu¹,XU Guangping¹,ZHANG Jinchi²

(1. 广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室,广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所,广西桂林 541006;2. 江苏省水土保持与生态修复重点实验室,南京林业大学林学院,江苏南京 210037)

(1. Guangxi Key Laboratory of Plant Conservation and Restoration Ecology in Karst Terrain, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. Jiangsu Province Key Laboratory of Soil and Water Conservation and Ecological Restoration, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu, 210037, China)

摘要:【目的】广西喀斯特石漠化地区水土流失和植被退化严重,土壤有效磷含量低是限制植被修复的因素之一,筛选乡土高效解磷菌株,可以加快修复石漠化生态环境。【方法】通过调查筛选石漠化地区常见植物根际土壤解磷菌,检测解磷菌株解磷能力,并将优良菌株培养后接种至顶果木(*Acrocarpus fraxinifolius*)幼苗根际土壤,检测解磷菌对植物的促生效应。【结果】石漠化地区土壤中解磷微生物丰富,共筛选出20株解有机磷菌和24株解无机磷菌,分别属于11个类群,其中,假单胞菌属(*Pseudomonas*)为石漠化植物根际土壤解磷菌的优势类群。解有机磷菌解磷能力为35.4~79.2 μg/mL,解无机磷菌解磷能力为112~253.2 μg/mL。接种解磷菌剂对顶果木生长和养分吸收具有显著促进作用,植株地上生物量比对照增加14.5%~30.5%,根系生物量比对照增加27.6%~45.7%。接种IP-HLG1和IP-CTM11处理的植株氮、磷含量显著高于对照处理,分别比对照处理高9.3%、19.7%和24.6%、20.3%。与对照处理相比,接种菌剂处理土壤有效磷含量增加了34.5%~69.1%,IP-HLG1和IP-CTM11处理增加显著。【结论】石漠化土壤中解磷菌以假单胞菌属为优势类群,筛选的解磷菌株

IP-HLG1和IP-CTM11对顶果木幼苗生长具有显著促进作用,对石漠化土壤磷元素活化能力较强,可作为研发微生物肥料的潜在功能菌株。

关键词:喀斯特 解磷菌 根际促生菌 植被修复

中图分类号:S714.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)05-0590-09

Abstract: 【Objective】 The low available phosphorus content in soil is one of the limiting factors for local vegetation restoration. Screening the high efficiency phosphate solubilizing bacte-

收稿日期:2018-08-29

作者简介:张中峰(1983-),男,博士,副研究员,主要从事土壤微生物与环境修复研究,E-mail:78228546@qq.com。

* 国家自然科学基金项目(41603079),广西科技攻关计划项目(桂科攻1598016-12),广西重点研发计划项目(桂科AB18126065)和广西喀斯特植物保育与恢复生态学重点实验室课题(17-259-23)资助。

** 通信作者。

rial strains can speed up the restoration of rocky desertification ecological environment. **【Methods】**In this study, the phosphate solubilizing bacterial strains of the common plant rhizosphere soil in the rocky desertification area were investigated and screened, the phosphate solubilizing ability of phosphate solubilizing bacteria was detected, and the excellent strains were inoculated to the *Acrocarpus fraxinifolius* seedlings, and the effect of phosphate solubilizing bacterial strains on plant growth was detected. **【Results】**The results showed that phosphate solubilizing microorganisms were abundant in the rocky desertification area, and 20 strains of organophosphorus and 24 inorganic phosphate solubilizing bacterial strains were screened out, which belonged to 11 groups, respectively. Among them, *Pseudomonas* was the dominant group in the rhizosphere soil of rocky desertification plants. The phosphate solubilizing ability of organophosphorus bacteria was 35.4~79.2 g/mL and the phosphate solubilizing ability of inorganic phosphorus bacteria was 112~253.2 g/mL. The inoculation of phosphate solubilizing bacteria significantly promoted the growth and nutrient absorption of the *A. fraxinifolius* seedlings. Compared to the control seedlings, the aboveground biomass increased by 14.5%~30.5%, and the root biomass increased by 27.6%~45.7%. The nitrogen and phosphorus contents of the plants treated with IP-HLG1 and IP-CTM11 were significantly higher than those of the control treatments, which were 9.3%, 19.7%, 24.6%, and 20.3% higher than those of the control treatment, respectively. Compared to the control treatments, the soil effective phosphorus content in IP-HLG1 and IP-CTM11 treatments increased most significantly. **【Conclusion】**Preliminary studies showed that *Pseudomonas* was the dominant group of phosphate solubilizing bacteria in rocky desertification soil. The screened phosphate solubilizing bacterial strains IP-HLG1 and IP-CTM11 played a significant role in promoting the growth of *A. fraxinifolius* seedlings. These two strains had strong ability to activate available phosphorus in soil and could be used as potential functional strains for developing microbial fertilizers.

Key words: karst, phosphate solubilizing bacterial strains, plant rhizosphere bacteria, vegetation restoration

0 引言

【研究意义】磷是植物生长必需的元素,土壤中磷元素的有效性直接影响植物的生长发育。据报道,我国74%的耕地土壤缺磷,土壤中95%的磷为难溶态磷,不能被植物吸收利用^[1]。施入土壤中的磷肥大部分会与土壤中的Ca²⁺、Fe²⁺、Al³⁺等结合形成难溶性磷酸盐,当年的利用率仅10%~25%^[2]。为满足农作物对磷元素的需求,农业生产过程中过量施肥也会导致潜在的环境风险。因此,如何有效利用土壤中被固定的无效态磷,并提高磷肥的使用效率,对减少农业生产中化肥的使用和资源的消耗,以及保护生态环境具有重要意义。广西石漠化地区土壤偏碱性,土壤中磷元素被矿物质紧密结合而导致其活性降低,成为植物生长的限制因子,石漠化土壤中有效磷的缺乏影响当地植被恢复和农业生产。因此,研究提高石漠化土壤磷元素有效性对石漠化植被修复具有积极意义。

【前人研究进展】植物根际存在一类特殊的微生物,通

过矿化作用或参与氧化还原反应,能将土壤中难溶性磷转化为能被植被吸收利用的可溶性磷,这类特殊的微生物被称为溶磷菌。溶磷菌可按分解底物分为两类:一类是能将土壤中植物难以吸收利用的无机磷酸盐转化为可以直接吸收利用形态磷的微生物称为解无机磷菌;另一类是能矿化有机磷化合物的微生物称为解有机磷菌。解磷微生物主要存在于土壤和植物根际中,由于植物根际有丰富的碳水化合物、氨基酸、维生素等物质,为根际微生物的繁殖提供了大量的能源,植物根际区域的微生物数量、种类以及代谢活性都远高于非根际区域,因此植物根际土壤是筛选解磷细菌的适宜生境^[3]。目前已报道的解磷菌包括细菌、真菌和放线菌,其中细菌最多,约20个属。近年来,研究人员在不同地区植物根际土壤中筛选出多种高效解磷菌株,如徐欢等^[4]从福建桉树(*Eucalyptus robusta*)根际土壤中筛选了26株解磷菌;郭艺鹏等^[5]从新疆枣树(*Ziziphus jujuba*)根际筛选了4株解磷菌;杨艳华等^[1]从河南茶树(*Camellia*

sinensis) 根际土壤筛选出解磷细菌 36 株;徐睿等^[6]从海南降香黄檀(*Dalbergia odorifera*) 根际土壤中筛选出 19 株解磷细菌。目前关于广西石漠化地区植物根际土壤解磷细菌筛选及解磷菌对植被促生效应的研究还未见报道。【本研究切入点】石漠化地区植被抗逆性差,造林成活率低,土壤养分有效性低是原因之一,因此,如果能筛选出乡土高效解磷菌株,并进一步研发适合石漠化地区植被修复的微生物菌剂,则对加快石漠化地区生态修复非常有帮助。【拟解决的关键问题】本研究通过平板筛选、摇瓶培养和盆栽接种植物试验,拟筛选出乡土高效解磷菌,以期通过微生物方法促进石漠化造林植物生长,为研制高效微生物肥料提供基础资料,为加快喀斯特石漠化地区植被恢复和生态治理提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

根际土壤样品采集自广西平果县果化镇石漠化综合治理示范区,采集了青冈栎(*Cyclobalanopsis glauca*)、降香黄檀、任豆(*Zenia insignis*)、樟叶槭(*Acer cinnamomifolium*)、蒜头果(*Malania oleifera*)、顶果木、茶条木(*Delavaya toxocarpa*)、火龙果(*Hylocereus undatus*)、五节芒(*Miscanthus floridulus*) 根际土壤。采集 10~20 cm 深土壤中植物根系,将根系表面附着的土壤轻轻抖落在无菌袋中,带回实验室置于 4℃ 冰箱中保存。共采集 27 份土壤样品。

无机磷液(固)体培养基:葡萄糖 10.0 g、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5.0 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g、 KCl 0.2 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、 NaCl 0.2 g、 MnSO_4 0.03 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g,加蒸馏水至 1 000 mL,pH 值为 7.0。制作无机磷固体培养基时,加入琼脂粉 18 g。

有机磷液(固)体培养基:葡萄糖 10.0 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、 NaCl 0.3 g、 KCl 0.3 g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g、卵磷脂 0.2 g、 CaCO_3 5 g、酵母膏 0.4 g,加蒸馏水至 1 000 mL,pH 值为 6.8~7.2。制作有机磷固体培养基时,加入琼脂粉 18 g。

LB 液体培养基:酵母膏 5 g,蛋白胨 10 g,氯化钠 5 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 值为 7.0。

1.2 方法

1.2.1 解磷细菌的初步筛选与培养基

称取 10 g 土壤样品,放入盛有 90 mL 无菌水的三角瓶中,28℃、170 r/min 振荡 10 min,得到根际土

壤悬浮液,采用梯度稀释法,获得浓度为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} g/mL 的土壤悬液。利用涂布法,将 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} g/mL 的土壤悬液分别涂布在解磷固体培养基上,每个处理重复 3 次,28℃ 倒置培养 3 d,挑出有透明圈的菌落进行纯化并保存。将纯化的初筛菌株接种到固体培养基上,28℃ 培养 7 d 后,分别测定解磷圈直径(D)和菌落直径(d),并计算溶磷圈直径和菌落直径的比值(D/d)。

1.2.2 菌株的 16S rDNA 基因扩增及分子鉴定

以细菌菌液为 DNA 模板,用 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增,正向引物:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物:5'-GGTACCTTGTACGACTT-3'。PCR 反应体系:DNA 模板 1 μL ,引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,2×ES Taq MasterMix 12.5 μL ,加超纯水补至 25 μL 。PCR 反应条件:94℃ 变性 2 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,终延伸 2 min。纯化后的 PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测定的序列在 GenBank 中用 Blast 软件与已知的 16S rDNA 基因序列进行同源性比对,选取同源性在 99% 以上、序列长度相当的 16S rDNA 序列,采用 BioEdit 7.1 进行 Alignment 后,用 MEGA 5.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,自展数(Bootstrap)为 1 000。

1.2.3 解磷菌解磷活性的测定

将初步筛选的菌株分别接种在 50 mL 无机磷和有机磷液体培养基中,在 28℃、170 r/min 振荡 3 d,然后转移至 50 mL 灭菌的离心管中,采样超声波破碎细胞 20 min,然后在 4 000 r/min 离心 20 min,取 2.5 mL 上清液于 50 mL 容量瓶中定容。以不接种菌株发酵液为对照,测定上清液 OD 值,计算出上清液中有效磷含量,以反应液中有效磷含量表示菌株解磷能力大小,每处理设置 3 个重复。

1.2.4 盆栽接种实验

从筛选的菌株中,选取 5 株 $D/d > 2.0$,溶磷量 $> 200 \mu\text{g/mL}$ 的菌株作为试验菌株。用接种环将 5 株解磷菌分别接种至 LB 液体培养基中,30℃、180 r/min 摇床培养至对数期,将菌悬液用无菌水洗涤 3 次后垂悬。用注射器在每盆植物根际土壤中加入 5 mL 菌悬液,每 15 d 接菌 1 次,接种终浓度为 10^6 CFU/g,对照组接种等量无菌水,每处理 8 次重复,随机区组排列,放置于温室条件下培养 3 个月。

供试土壤为石漠化地区采集的碳酸岩发育的土壤,自然条件下风干后去除石砾和根系,塑料花盆大小为 13 cm×14 cm×15 cm,每盆装入土壤 1.5 kg。

土壤有机质含量为 5.2%，全氮含量为 1.8 g/kg，碱解氮为 72 mg/kg，全磷为 0.60 g/kg，速效磷为 4.9 mg/kg，全钾为 6.2 g/kg，速效钾为 47.8 mg/kg。

供试苗木为顶果木，种子用 3% 次氯酸钠浸泡 3 min，无菌水冲洗 3 次，催芽 2 d 后，播种于育苗盘，待幼苗长出 3~4 片真叶后，挑选大小、长势一致的幼苗移栽到装有试验基质的花盆中，移栽 1 株幼苗。

苗木培育 90 d 后，测量株高、地径和叶面积，并取出全株并清洗根系，将地上地下部分分别烘干称重计算生物量，利用 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮法测定植株全氮含量，利用钼钒黄吸光光度法测定全磷含量，利用火焰光度法测定植物全钾含量。采集根际土壤，利用碳酸氢钠—钼锑抗比色法测定土壤有效磷含量。

1.3 数据分析

实验数据利用 Excel2007 和 SPSS17.0 软件进行处理，多重比较采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 植物根际土壤解磷细菌的解磷活性

利用解磷培养基进行初步筛选，发现石漠化地区

表 1 石漠化地区植物根际土壤解磷细菌解磷活性

Table 1 Phosphorus solubilizing activity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere soil of rocky desertification area

菌株编号 Strain number	分类 Genus	登录号 Gen bank accession number	菌落直径 <i>d</i> Colony diameter (mm)	溶磷圈直径 <i>D</i> Diameter of phosphate dissolving ring(mm)	<i>D/d</i>	解磷活性 Phosphate solubilizing activity ($\mu\text{g/mL}$)	pH
OP-HLG2	<i>Pseudomonas</i> sp.	KC756421	6.0	18.0	3.0	48.5	4.77
OP-HLG3	<i>Pseudomonas</i> sp.	KY440054	4.5	15.8	3.5	55.6	4.60
OP-HLG4	<i>Bacillus</i> sp.	MF062964	4.9	9.5	1.9	45.3	4.61
OP-HLG5	<i>Pseudomonas</i> sp.	MH236683	5.5	14.8	2.7	62.3	4.78
OP-HLG6	<i>Pseudomonas</i> sp.	MG819237	3.4	12.0	3.5	45.0	5.46
OP-HLG8	<i>Pseudomonas</i> sp.	KY324839	4.5	11.8	2.6	39.6	6.02
OP-HLG9	<i>Burkholderia</i> sp.	MG062739	5.0	16.6	3.3	60.2	4.71
OP-HLG10	<i>Staphylococcus</i> sp.	KY622234	9.7	13.6	1.4	48.6	4.10
OP-JXHT2	<i>Pseudomonas</i> sp.	FJ605430	3.3	9.8	3.0	35.4	5.80
OP-JXHT3	<i>Pseudomonas</i> sp.	KF011704	5.6	14.8	2.6	48.8	4.62
OP-HLG21	<i>Enterobacter</i> sp.	CP028950	4.9	8.5	1.7	49.6	4.67
OP-HLG23	<i>Enterobacter</i> sp.	MG754444	1.9	7.1	3.7	63.2	4.72
OP-HLG24	<i>Enterobacter</i> sp.	JF494822	2.9	8.4	2.9	55.2	4.67
OP-HLG26	<i>Bacillus</i> sp.	KU983803	7.2	9.2	1.3	39.3	6.52
OP-HLG27	<i>Pseudomonas</i> sp.	MG859608	8.8	19.0	2.1	42.5	4.56
OP-QGL2	<i>Pseudomonas</i> sp.	JN615766	4.7	12.1	2.6	49.8	5.09
OP-RD1	<i>Pseudomonas</i> sp.	LK391528	6.0	12.7	2.1	79.2	4.87
OP-RD2	<i>Bacillus</i> sp.	MF681975	4.8	7.3	1.5	62.6	4.48
OP-RD3	<i>Arthrobacter</i> sp.	MF077117	7.0	10.3	1.5	45.2	5.91
OP-ZYQ2	<i>Acinetobacter</i> sp.	MH211299	4.6	7.1	1.5	66.3	4.64
OP-ZYQ3	<i>Paenibacillus</i> sp.	JQ357213	7.0	12.0	1.7	51.3	5.20
OP-ZYQ4	<i>Enterobacter</i> sp.	JX485634	10.0	23.1	2.3	70.5	4.72

植物根际土壤中存在大量解有机磷细菌和解无机磷细菌。溶磷圈直径 (*D*) 和菌落直径 (*d*) 的比值是初步判断解磷细菌相对解磷能力的指标，根据比值大小，筛选出 $D/d > 1.0$ 的解有机磷和解无机磷细菌共 44 株(表 1)，其中解无机磷细菌 20 株，占 45.5%；解有机磷细菌 24 株，占 54.5%。

通过测定 44 株解磷菌的解磷活性，发现解无机磷细菌解磷活性高于解有机磷细菌。24 株解有机磷细菌中，解磷活性均小于 100 $\mu\text{g/mL}$ ；其中，解磷活性大于 50 $\mu\text{g/mL}$ 的有 11 株；20 株解无机磷细菌解磷活性均超过 100 $\mu\text{g/mL}$ ，其中， $> 200 \mu\text{g/mL}$ 的有 5 株：IP-HLG1、IP-HLG23、IP-CTM11、IP-STG12、IP-JXHT15，这 5 株解磷细菌分别是采集自火龙果、茶条木、蒜头果和降香黄檀根际土壤，解磷活性分别为 224.9 $\mu\text{g/mL}$ 、212.7 $\mu\text{g/mL}$ 、253.2 $\mu\text{g/mL}$ 、233.4 $\mu\text{g/mL}$ 和 214.7 $\mu\text{g/mL}$ 。

由图 1 可知，解有机磷细菌解磷活性与菌液 pH 值无显著相关，解无机磷细菌解磷活性与菌液 pH 值呈显著负相关关系。

Continue table 1

菌株编号 Strain number	分类 Genus	登录号 Gen bank accession number	菌落直径 <i>d</i> Colony diameter (mm)	溶磷圈直径 <i>D</i> Diameter of phosphate dissolving ring(mm)	<i>D/d</i>	解磷活性 Phosphate solubilizing activity ($\mu\text{g/mL}$)	pH
OP-HLG28	<i>Bacillus</i> sp.	MF540532	15.0	20.0	1.3	47.5	4.68
OP-CTM11	<i>Streptomyces</i> sp.	KF999723	6.0	12.0	2.0	52.5	4.96
IP-HLG1	<i>Pseudomonas</i> sp.	HG794312	6.7	20.6	3.1	224.9	4.84
IP-CTM10	<i>Burkholderia</i> sp.	LC070196	11.0	21.0	1.9	117.1	6.60
IP-CTM11	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX258470	10.0	28.2	2.8	253.2	4.40
IP-STG12	<i>Streptomyces</i> sp.	MF197388	7.9	24.7	3.1	233.4	4.36
IP-JXHT14	<i>Sphingomonas</i> sp.	DQ139343	8.0	14.0	1.8	149.4	5.90
IP-JXHT15	<i>Streptomyces</i> sp.	KC245102	5.0	12.0	2.4	214.7	4.86
IP-STG16	<i>Streptomyces</i> sp.	KP986569	12.0	15.0	1.3	197.1	5.62
IP-QGL20	<i>Streptomyces</i> sp.	KU901722	7.0	13.0	1.9	151.7	5.92
IP-HLG23	<i>Pantoea</i> sp.	KY127412	6.0	16.0	2.7	212.7	5.13
IP-CTM1	<i>Pseudomonas</i> sp.	KX348463	8.0	12.3	1.5	178.2	5.65
IP-GZC1	<i>Pseudomonas</i> sp.	KU647216	6.0	7.0	1.2	125.6	5.88
IP-GZC2	<i>Pseudomonas</i> sp.	KM253123	7.0	8.7	1.2	143.5	5.60
IP-JXHT2	<i>Pseudomonas</i> sp.	EU680973	6.0	11.0	1.8	128.3	6.50
IP-KJT1	<i>Enterobacter</i> sp.	LC186020	2.3	7.3	3.2	112.0	5.90
IP-QLG4	<i>Pseudomonas</i> sp.	KJ184894	3.7	4.7	1.3	131.4	6.47
IP-QLG6	<i>Pseudomonas</i> sp.	KY819006	5.7	13.0	2.3	187.5	5.53
IP-QLG7	<i>Pseudomonas</i> sp.	KJ806463	8.0	14.3	1.8	156.3	5.87
IP-WJM1	<i>Pseudomonas</i> sp.	HQ220023	5.0	6.0	1.2	177.2	5.41
IP-WJM3	<i>Pseudomonas</i> sp.	KY817593	9.0	11.7	1.3	150.4	5.50
IP-WJM10	<i>Pseudomonas</i> sp.	KT758848	8.7	10.0	1.2	120.5	5.66

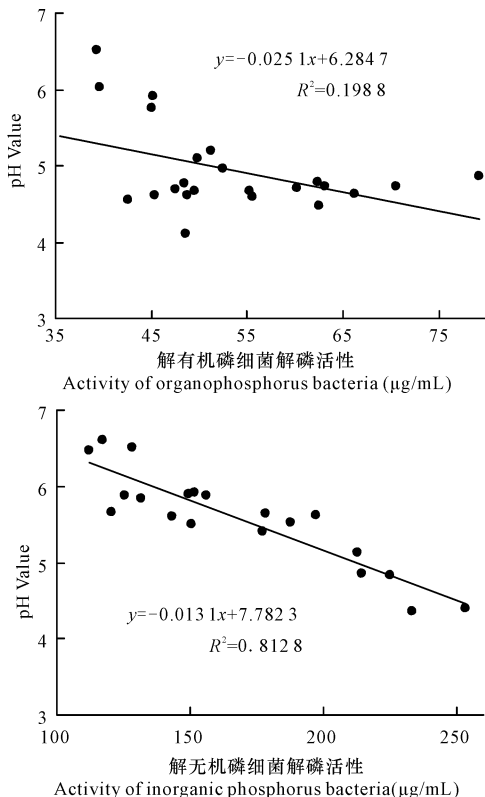


图 1 解磷菌解磷活性与培养液 pH 值相关性

Fig. 1 Correlation between phosphate-solubilizing bacteria activity and pH value of culture medium

2.2 解磷细菌 16S rDNA 基因序列分析

通过基因序列分析,筛选的解磷细菌可以分为 11 个分类群(图 2),即假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、鞘氨醇单胞菌属(*Sphingomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)。其中,假单胞菌属为优势类群,占 50%,链霉菌属和肠杆菌属为次优势类群,各占 11.4%。接种试验用的 5 个菌株 IP-HLG1 和 IP-CTM11 属于假单胞菌、IP-STG12 和 IP-JXHT15 属于链霉菌属、IP-HLG23 属于泛菌属。

2.3 解磷菌剂对顶果木苗木的生长促进作用

接种解磷菌剂对顶果木幼苗生长具有显著促进作用。与对照处理相比,接种 IP-HLG1、IP-CTM11 和 IP-STG12 处理植株株高分别增加 13.1%、16.8% 和 9.8%,地径分别增加 6.7%、15.6% 和 13.3%,而接种 IP-JXHT15 和 IP-HLG23 处理与对照处理无显著差异(表 2)。所有接菌处理植株的叶面积均显著

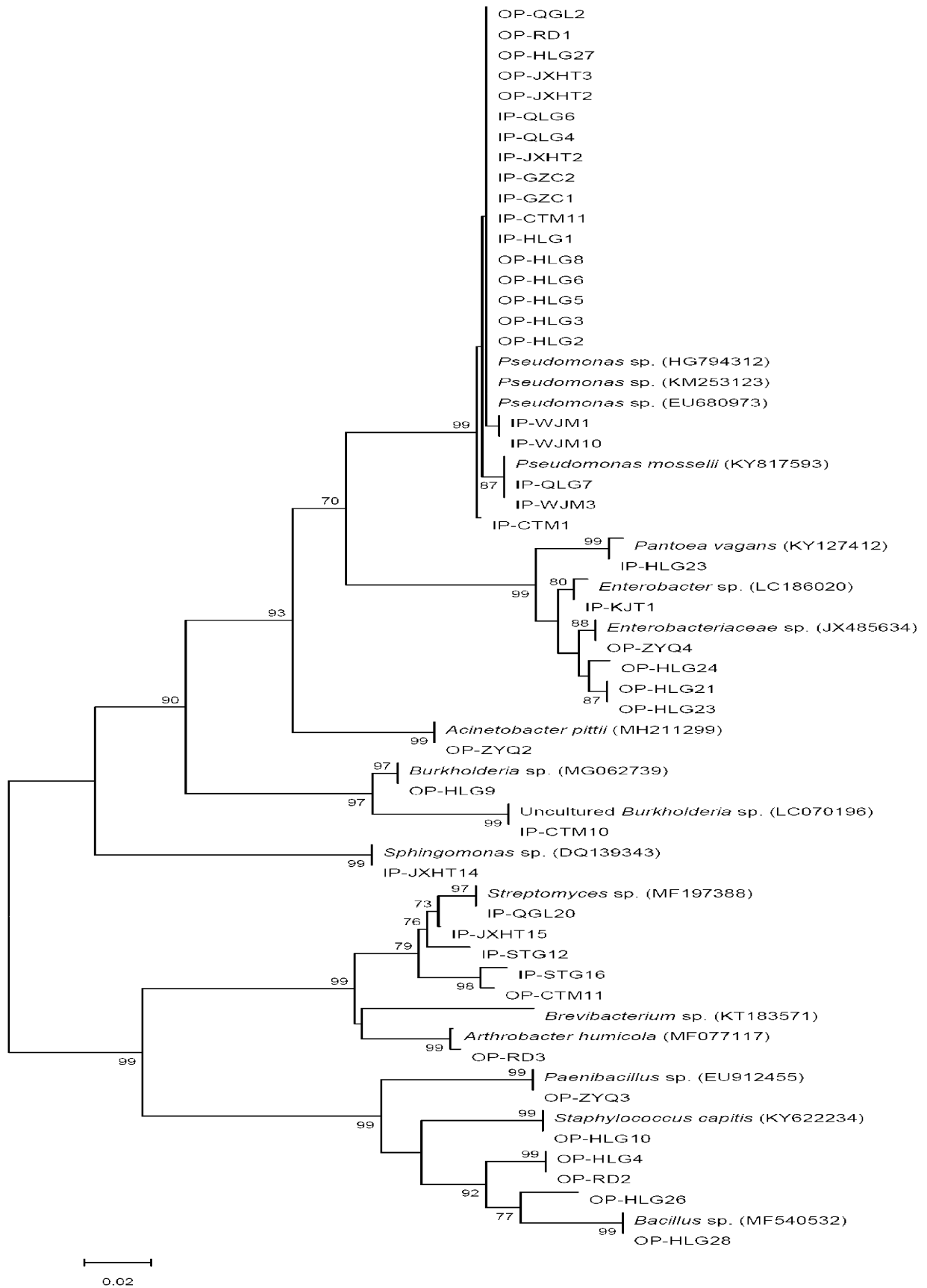


图 2 石漠化地区植物根际土壤解磷菌 16S rDNA 基因系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequences of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere soil in rocky desertification areas

提高,相比对照处理增加 14.5%~56.2%。植株地上生物量与根系生物量类似,接菌处理均显著高于对照处理,地上生物量比对照增加 14.5%~30.5%,根系生物量比对照增加 27.6%~45.7%。接种 IP-HLG1 和 IP-CTM11 处理的植株氮、磷含量显著高于对照处理,分别比对照处理高 9.3%、19.7% 和 24.6%、20.3%。同时,接种 IP-HLG1 和 IP-CTM11

表 2 解磷菌剂对顶果木生长和养分吸收的作用

Table 2 Effects of phosphate solubilizing bacteria on growth and nutrient uptake of *Acrocarpus fraxinifolius* seedlings

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	地径 Stem diameter (mm)	叶面积 Leaf area(cm ²)	地上干重 Shoot biomass(g)	根系干重 Root biomass(g)	氮含量 N content (mg/g)	磷含量 P content (mg/g)	钾含量 K content (mg/g)
IP-HLG1	40.5a	4.8a	41.01a	7.11a	1.53a	41.46a	2.33a	11.21a
IP-CTM11	41.8a	5.2a	43.52a	6.82a	1.49a	45.40a	2.25a	10.87a
IP-STG12	39.3a	5.1a	39.8a	6.24b	1.39b	37.50b	1.88b	11.35a
IP-JXHT15	34.5b	4.4b	33.67b	6.53ab	1.38b	38.62b	2.03ab	10.46a
IP-HLG23	36.9b	4.3b	31.89b	6.37b	1.34b	39.39b	1.84b	10.93a
Control	35.8b	4.5b	27.86c	5.45c	1.05c	37.92b	1.87b	10.48a

注:同列数据后附不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Note: The same column data followed by different lowercase letters indicate significant difference ($P < 0.05$)

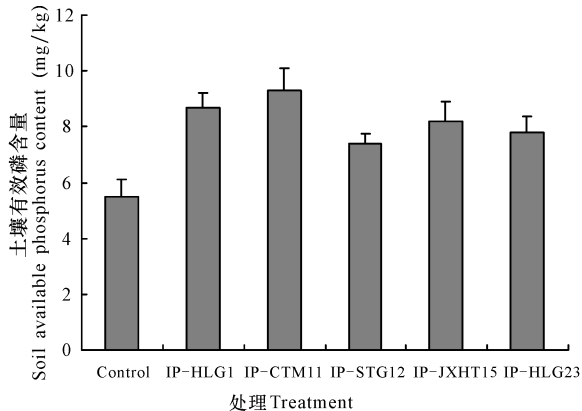


图 3 接种解磷菌对石漠化土壤有效磷含量的影响

Fig. 3 Effect of phosphate solubilizing bacteria on the content of available phosphorus in rocky desertification soil

3 讨论

本研究从广西石漠化地区常见植物根际土壤中筛选出 44 株解磷效果较好的解磷菌,包括 20 株解有机磷菌和 24 株解无机磷菌。筛选出的解磷菌分属于 11 个类群,其中假单胞菌属占 50%。不同菌株解磷活性差异较大,解有机磷细菌溶解卵磷脂能力为 35.4~79.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,解无机磷菌溶解磷酸三钙能力为 112~253.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。用盆栽法进一步研究了 5 株解磷活性较强的解无机磷菌对顶果木幼苗的促生作用,结果表明,解磷菌对顶果木幼苗的叶面积和生物量具有显著促进作用,接种 IP-HLG1、IP-CTM11 和 IP-STG12 处理显著促进了幼苗株高和地径的生长,并且 IP-HLG1 和 IP-CTM11 菌株显著促进了植株

处理的植株全氮、全磷含量也显著高于其他 3 种接种处理,与对照处理相比,接种处理植株全钾含量无显著增加。接种解磷菌剂处理土壤有效磷含量显著增加,与对照处理相比,接种处理土壤有效磷含量增加 34.5%~69.1% (图 3)。其中,IP-CTM11 和 IP-HLG1 处理土壤有效磷含量最高,分别达到 9.3 mg/kg 和 8.7 mg/kg 。

对氮、磷元素的吸收。所有接菌处理土壤有效磷含量显著提高,比对照处理增加 34.5%~69.1%。

解磷菌包括细菌、真菌和放线菌,目前报道的解磷细菌占 20 个属,解磷真菌约 5 个属,解磷放线菌以链霉菌为主^[7-9]。对解磷细菌的研究中对解无机磷细菌研究较多^[10-12]。解磷菌在土壤中的分布受土壤质地、类型等环境因素影响,并且具有明显根际效应^[1,13-14]。如在黑钙土中解磷细菌主要为芽孢杆菌属和假单胞菌属;黄棕壤和红壤中解磷细菌种类较为丰富,以芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属为主^[14]。本研究从石漠化常见植物根际土壤分离出的解磷菌分属 11 个类群,其中假单胞菌属占所筛选菌株总数的 50%,表明石漠化土壤中解磷菌以假单胞菌属为优势类群。在调查的植物根际土壤中,从火龙果根际土壤中筛选的解磷细菌最多,占 20%,这可能与火龙果根际土壤中施用农家肥较多有关。

目前常用溶磷圈直径与菌落直径比值 (D/d) 的大小来判断解磷细菌的解磷能力,但研究表明, D/d 与解磷活性呈弱相关关系^[4,15]。本研究也有相似结果,如在解有机磷细菌中菌株 OP-HLG23 的 D/d 为 3.7,解磷能力为 63.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而菌株 OP-RD1 的 D/d 为 2.1,但解磷能力达到 79.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。由于解磷菌对平板培养和液体培养两种方式的不同适应,有些菌株在液体培养方式下繁殖速度更快,解磷能力更强^[16]。

溶磷菌的溶磷机制复杂多样,通常认为主要是有机酸释放的 H^+ 、磷酸酶、蛋白质、腐殖酸、 H_2S 等多

种途径的溶磷作用。Goldstein^[17]研究认为一些解磷细菌分泌葡萄糖酸是解磷的主要机制,并认为细菌通过 Glutamate dehydrogenase(GDH)途径,利用葡萄糖脱氢酶在细胞膜外将葡萄糖氧化成葡萄糖酸,从而溶解磷。虞伟斌等^[18]研究 K3 菌株的溶磷机理,认为 K3 菌株在培养过程中并未产生葡萄糖酸,说明有些解磷菌株并非通过 GDH 途径解磷。有研究表明,菌株解磷活性与培养介质 pH 值具有显著负相关关系^[19],即培养液 pH 值越低,培养液中有效磷含量越高。本研究表明,解有机磷细菌解磷能力与培养液 pH 值无显著相关($R^2 = 0.1988$),而解无机磷细菌解磷能力与培养液 pH 值显著负相关($R^2 = 0.8128$)。这与徐欢等^[4]研究桉树根际土壤解磷细菌解磷能力结果相似。解无机磷菌在生长过程中分泌有机酸,释放 H^+ 降低介质 pH 值^[20];而解有机磷细菌是通过分泌胞外磷酸酶等非有机酸类物质来分解有机磷脂,因此其代谢产物对培养液 pH 值无显著影响^[4,21]。

添加解磷菌处理的土壤有效磷含量是对照处理土壤的 1.35~1.69 倍,表明实验选取的 5 个解磷菌株均能有效活化石漠化土壤中难溶性磷元素,能显著提高根际土壤有效磷含量,从而促进顶果木幼苗对磷元素的吸收。解磷菌剂不仅对顶果木幼苗磷氮磷吸收有不同程度的促进效应,而且对顶果木株高、地径、生物量和叶面积也有显著提高作用,这可能是由于解磷菌在活化土壤中难溶性磷元素促的同时还释放了生长素(IAA)、细胞分裂素(CK)等物质促进植物生长^[22],对解磷菌的促生特性还需要进一步深入研究。

4 结论

本研究通过调查和实验研究表明,石漠化地区植物根际土壤存在大量解磷微生物,筛选的乡土解磷菌对提高石漠化造林植物生长具有显著促进作用,本研究筛选的解磷菌株不仅能将石漠化土壤中难溶性磷转化为可溶性磷,而且对植物的生长发育具有明显促进作用。本研究筛选的假单胞菌 IP-HLG1 和 IP-CTM11 对植物促生能力和土壤磷素活化能力表现较好,可以作为研发解磷微生物肥的潜在资源菌种。利用乡土优良解磷菌剂不仅促进乡土树种生长、改善土壤磷元素有效性,同时可以提高菌株在石漠化土壤中的定殖能力和活性,这将有助于加速修复石漠化地区生态环境。

致谢:

试验得到了华南植物园博士生李艳琼以及长江大学本科生理梁阳、舒华威的帮助,在此表示感谢!

参考文献:

- [1] 杨艳华,李俊州,臧睿,等. 茶树根际土壤解磷细菌的筛选及解磷活性分析[J]. 河南农业科学,2014,43(9):60-65.
YANG Y H,LI J Z,ZANG R,et al. Screening and analysis of phosphate-solubilizing activity of phosphate-solubilizing bacteria from rhizosphere soil of tea plant[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences,2014,43(9):60-65.
- [2] 鲁如坤,时正元,顾益出,等. 土壤积累态磷研究 II. 磷肥的表观积累利用率[J]. 土壤,1995(6):286-289.
LU R K,SHI Z Y,GU Y C,et al. Study on accumulating phosphorus in soil II. Apparent accumulation and utilization rate of phosphate fertilizer[J]. Soils,1995(6):286-289.
- [3] 解文科,王小青,李斌,等. 植物根系分泌物研究综述[J]. 山东林业科技,2005(5):63-67.
XIE W K,WANG X Q,LI B,et al. A review of plant root exudates[J]. Shandong Forestry Science and Technology,2005(5):63-67.
- [4] 徐欢,俞新玲,林勇明,等. 桉树根际土壤解磷细菌的分离、筛选及其解磷效果[J]. 福建农林大学学报:自然科学版,2016,45(5):529-535.
XU H,YU X L,LIN Y M,et al. Isolation, screening of phosphate solubilizing capacity of phosphate solubilizing bacteria in *Eucalyptus* species[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science, 2016,45(5):529-535.
- [5] 郭艺鹏,李静,杨越,等. 枣根际解磷细菌解磷特性及影响因素分析[J]. 河南农业大学学报,2018,52(1):96-103.
GUO Y P,LI J,YANG Y,et al. Characteristics and influencing factors of phosphate solubilizing bacteria in jujube rhizosphere[J]. Journal of Henan Agricultural University,2018,52(1):96-103.
- [6] 徐睿,刘君昂,周国英,等. 降香黄檀-檀香根际土壤高效解磷细菌的分离筛选与鉴定[J]. 热带作物学报,2015,36(2):281-288.
XU R,LIU J A,ZHOU G Y,et al. Isolation, screening and identification of high-efficiency phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Dalbergia odorifera* and sandalwood[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015,36(2):281-288.
- [7] CHANG C H,YANG S S. Thermo-tolerant phosphate-solubilizing microbes for multi-functional biofertilizer preparations[J]. Bioresour Technology, 2009, 100(4): 1648-1658.
- [8] JEONG S,MOON H S,SHIN D,et al. Survival of intro-

- duced phosphate-solubilizing bacteria (PSB) and their impact on microbial community structure during the phytoextraction of Cd-contaminated soil[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2013, 263(P2):441-449.
- [9] 韩丽珍, 邓兆辉, 朱春艳, 等. 茶树根际促生菌的筛选与促生特性的研究[J]. *山地农业生物学报*, 2016, 35(1): 51-56.
- HAN L Z, DENG Z H, ZHU C Y, et al. Identification and characterization of plant growth - promoting rhizobacteria isolated from rhizosphere soils of tea trees [J]. *Journal of Mountain Agriculture and Biology*, 2016, 35(1):51-56.
- [10] OTEINO N, LALLY RD, KIWANUKA S, et al. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6:745.
- [11] GHOSH R, BARMAN S, MUKHERJEE R, et al. Role of phosphate solubilizing *Burkholderia* spp. for successful colonization and growth promotion of *Lycopodium cernuum* L. (Lycopodiaceae) in lateritic belt of Birbhum district of West Bengal, India[J]. *Microbiological Research*, 2016, 183:80-91.
- [12] 晋婷婷, 任嘉红, 刘瑞祥. 南方红豆杉根际解有机磷细菌的鉴定及其解磷特性和促生作用研究[J]. *西北植物学报*, 2016, 36(9):1819-1827.
- JIN T T, REN J H, LIU R X. Identification, characterization and growth-promoting effects of an organophosphate-solubilizing bacterium from *Taxus chinensis* var. *mairei* rhizosphere[J]. *Acta Bot Boreal-Occident Sin*, 2016, 36(9):1819-1827.
- [13] 王光华, 赵英, 周德瑞, 等. 解磷菌的研究现状与展望[J]. *生态环境*, 2003, 12(1):96-101.
- WANG G H, ZHAO Y, ZHOU D R, et al. Review of phosphate - solubilizing microorganisms [J]. *Ecology and Environment*, 2003, 12(1):96-101.
- [14] 尹瑞龄. 我国旱地土壤的溶磷微生物[J]. *土壤*, 1988(5):243-246.
- YING R L. Phosphorus solubilizing microorganisms in dry land soil of China[J]. *Soils*, 1988(5):243-246.
- [15] 叶震, 陈秀蓉, 杨淑君. 东祁连山高寒植被土壤解磷菌筛选及其解磷能力的初步研究[J]. *草原与草坪*, 2010, 30(5):6-10.
- YE Z, CHEN X R, YANG S J. Primary study on isolation and ability of phosphorus-solubilizing bacteria in soil of alpine vegetation in eastern Qilian Mountains [J]. *Grassland and Turf*, 2010, 30(5):6-10.
- [16] CHEN Y P, REKHA P D, ARUN A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities [J]. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(1):33-41.
- [17] GOLDSTEIN A H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram - negative bacteria [M]// TORRIANI-GORINI A, YAGIL E, SILVER S. Phosphate in microorganisms: Cellular and molecular biology. Washington DC: ASM Press, 1994:197-203.
- [18] 虞伟斌, 杨兴明, 沈其荣, 等. K3 解磷菌的解磷机理及其对缓冲容量的响应[J]. *植物营养与肥料学报*, 2010, 16(2):354-361.
- YU W B, YANG X M, SHEN Q R, et al. Mechanism on phosphate solubilization of *Pseudomonas* sp. K3 and its phosphate solubilization ability under buffering condition[J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2010, 16(2):354-361.
- [19] 乔志伟, 洪坚平, 谢英荷, 等. 石灰性土壤拉恩式溶磷细菌的筛选鉴定及溶磷特性[J]. *应用生态学报*, 2013, 24(8):2294-2300.
- QIAO Z W, HONG J P, XIE Y H, et al. Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of *Rahnella* sp. phosphate-solubilizing bacteria in calcareous soil[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, 24(8):2294-2300.
- [20] 贺梦醒, 高毅, 胡正雪, 等. 解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. *应用生态学报*, 2012, 23(1):235-239.
- HE M X, GAO Y, HU Z X, et al. Screening, identification, and phosphate-solubilizing capability of phosphate-solubilizing bacterial strain B25[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, 23(1):235-239.
- [21] 李蓉, 周德明, 吴毅, 等. 杉木根际溶磷菌筛选及其部分特性的初步研究[J]. *中南林业科技大学学报*, 2012, 32(4):95-99.
- LI R, ZHOU D M, WU Y, et al. Selection and characteristics of phosphate - solubilizing bacteria in rhizosphere of *Cunninghamia lanceolata*[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2012, 32(4):95-99.
- [22] 柯春亮, 李淑娟, 段雅婕. 解磷菌剂对香蕉幼苗生长及土壤理化因子的影响[J]. *海南大学学报:自然科学版*, 2017, 35(3):253-259.
- KE C L, LI S J, DUAN Y J. Effects of phosphate-solubilizing bacteria on the growth of banana seedlings and physical and chemical factors[J]. *Natural Science Journal of Hainan University: Natural Science*, 2017, 35(3):253-259.

(责任编辑:符支宏)