

文章编号:1001-1498(2004)01-0089-06

# 红树林根际解磷菌分离、培养 及解磷能力的研究

万璐, 康丽华, 廖宝文, 马海宾, 江业根

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

**摘要:**本实验从红树林根际分离出不同种类的解磷细菌,经过筛选获得一株解磷能力较强的菌株 ZB0211,在纯培养的条件下,对这株解磷菌进行最适培养条件试验。结果表明:碳源以  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的蔗糖最佳,氮源以  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{NH}_4\text{Cl}$  最好,  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{NaCl}$  浓度为最适生长浓度,最适初始 pH 值为 7.5。同时进行的解磷能力实验也表明 pH 值、菌数与解磷能力这三者之间存在一定的相关性。

**关键词:**红树林;解磷细菌;分离;培养条件;解磷强度

**中图分类号:**S794.9      **文献标识码:**A

磷是植物生长发育所必需的重要营养元素之一,但是土壤中的磷绝大部分呈有机或无机磷化物状态,植物不能直接吸收,解磷菌能将植物难以吸收利用的磷转化为植物可吸收利用的磷<sup>[1]</sup>,因此,利用微生物的解磷作用弥补土壤磷素营养的不足,成为当前国内外非常关注的研究课题。本研究试图利用微生物改善红树林土壤中磷素缺乏问题。红树林是生长在热带亚热带海岸潮间带,受到海水周期性浸淹的木本植物群落。由于间隙水富含阳离子,磷酸盐通常沉淀在底泥中,致使大量的磷元素不能被红树林直接利用<sup>[2]</sup>,影响红树林的生长,所以提高磷素利用率对促进红树植物生长有重要意义。本研究从红树林根际分离不同种类的解磷菌,并进行培养条件及解磷能力的研究,为红树林人工接种解磷菌提供优良菌株与培养技术。

## 1 材料与方 法

### 1.1 红树林根际解磷菌株的分离

从湛江高桥红树林保护区内采集红树植物根系,主要包括白骨壤 (*Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.)、无瓣海桑 (*Sonneratia apertala* Buch.-Ham) 和木榄 (*Bruguiera gymnorrhiza* (L.) Lamk),用无菌胶袋装好带回实验室。在实验室内把附着在根表面的土抖掉,在流水下轻轻冲洗干净后,再用无菌水冲洗 5~8 次,用消毒灭菌过的解剖刀切成 0.5~1.0 cm 的根段,分别置于装有 50 mL 改良 SRSM 培养液的三角瓶中,在 28~30 °C 摇床培养 5 d ( $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ )。随后取样稀释涂平板,挑取典型菌落进一步纯化培养<sup>[3]</sup>。

收稿日期:2003-06-15

基金项目:广东省技术厅国际合作项目“红树林 PGPB 菌研究(2KB0682W)”

作者简介:万璐(1980—),女,江西南昌人,在读研究生。

## 1.2 解磷菌的培养

培养基采用改良的 SRSM 无机磷培养基<sup>[4]</sup>。采用液体振荡培养法( $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ),培养温度为  $28 \sim 30$ ,培养时间  $3 \sim 5 \text{ d}$ 。

## 1.3 解磷菌数量测定方法

采用比浊法。将培养好的菌液在 721 型分光光度计上比色,以  $600 \text{ nm}$  的光密度值(OD 值)作为解磷菌密度指标。

## 1.4 解磷能力的测定

1.4.1 液体解磷能力测定 将不加磷源的改良 SRSM 液体培养基  $100 \text{ mL}$  分装在  $250 \text{ mL}$  三角瓶中, $1 \times 10^5 \text{ Pa}$ , $30 \text{ min}$  灭菌,接种前精确加  $1 \text{ g}$  灭菌  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  粉,接种量  $4\%$ , $29 \sim 31$ , $190 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养  $36 \text{ h}$ , $9\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心  $5 \text{ min}$ ,上清液用磷钼兰比色法<sup>[5]</sup>测定水溶性磷含量,以水溶性磷含量占  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  粉全磷含量的百分比作为磷细菌的磷素转化率。每株菌 3 次重复。

1.4.2 固体解磷能力测定 将筛选出的解磷能力较强的菌株,摇床培养  $24 \text{ h}$  后的菌液适当稀释后分别涂在装有  $15 \text{ mL}$  固体 SRSM 培养基的平板上, $30$  恒温培养  $72 \text{ h}$ ,观测解磷透明圈大小。

1.4.3 pH 值、菌数以及解磷能力动态测定 每隔  $6 \text{ h}$  取样测定培养液的 pH 值、菌数和水溶性磷含量。磷素转化率的测定方法同上,pH 值用 pHS-3C 型酸度计直接测定,菌数的测定采用稀释平板法。

## 1.5 培养条件的研究

基础培养基用  $1.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$  可溶性磷源替换改良 SRSM 培养基的原有磷源。以下试验每组处理均进行 3 次重复。

1.5.1 碳源试验 去掉基础培养基中原有的碳源,分别添加  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的葡萄糖、蔗糖、淀粉 3 种试验碳源。

1.5.2 氮源试验 去掉基础培养基中原有的氮源,分别添加  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母提取物以及酪蛋白水解物。

1.5.3 pH 值试验 采用基础培养基,灭菌前将 pH 值调至  $5.0$ 、 $6.0$ 、 $6.5$ 、 $7.0$ 、 $7.5$ 、 $8.0$ 。

1.5.4 NaCl 试验 基础培养基中的 NaCl 浓度分别为  $5$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

# 2 结果与分析

## 2.1 解磷菌分离结果

表 1 对分离菌株(10 株)及引进的墨西哥红树林菌株(3 株)的材料来源地、宿主植物和菌落特征进行了描述。分离菌株来自三种宿主植物,菌落大都呈圆形或近圆形,表面光滑,质地松软,其中 ZB0211、ZB0212、ZB0204 和 ZW0405 生长快,筛选优良菌株时可优先考虑。

## 2.2 解磷能力的比较

13 株解磷菌的解磷能力见表 2。从表 2 看出,供试菌株对磷的平均转化率为  $0.06\% \sim 8.01\%$ ,方差分析表明不同菌株的转化率之间差异显著,经 LSR 分析可知其中菌株 ZB0211 的解磷能力最强,其转换率为  $8.01\%$ ,ZM0609 菌株的解磷能力最弱,其转化率为  $0.06\%$ 。比较后,初步筛选出解磷能力强的优良菌株 ZB0211。

表 1 分离菌株及菌落特征

菌株号	材料来源地	宿主植物	菌落特征(培养 4 d)
ZB0211	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	圆形中凹陷起状,表面光滑,杏黄色
ZB0212	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	近圆形隆起状,表面光滑,褐色
ZB0204	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	椭圆形稍凸起,表面光滑,象牙黄色
ZB0205	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	圆形稍凸起,表面光滑,谷黄色
ZB0306	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	圆形稍凸起,表面粗糙,乳白色
ZB0307	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	近圆形稍隆起,表面光滑,褐色
ZB0409	湛江高桥镇红树林保护区	白骨壤	圆形突起状,表面光滑,苹果红色
ZW0405	湛江高桥镇红树林保护区	无瓣海桑	圆形中凹陷起状,表面光滑,酪黄色
ZW0507	湛江高桥镇红树林保护区	无瓣海桑	近圆形稍凸起,表面光滑,乳白色
ZM0609	湛江高桥镇红树林保护区	木榄	圆形稍凸起,表面粗糙,鸭舌黄色
B. atr	墨西哥西北生物中心	白骨壤	假根状,表面粗糙,荔肉白色
B. amy	墨西哥西北生物中心	白红树	不规则状,表面光滑,荔肉白色
B. lic	墨西哥西北生物中心	白红树	不规则状,边缘不整齐,褚红色

表 2 发酵液磷素转化率

菌株	含磷量/(mg L <sup>-1</sup> )	转化率/ %	菌株	含磷量/(mg L <sup>-1</sup> )	转化率/ %
ZB0211	160.11	8.01 a	B. amy	42.38	2.12 f
ZB0212	153.02	7.66 b	ZB0205	37.74	1.89 g
ZB0204	152.55	7.63 b	ZB0307	28.42	1.42 h
ZB0409	107.13	5.36 c	ZW0405	25.02	1.25 i
B. atr	96.32	4.82 d	ZW0507	2.54	0.13 j
B. lic	81.73	4.08 e	ZM0609	1.10	0.06 k
ZB0306	42.60	2.13 f			

注:转化率后英文字母不同者表明经 LSR 分析差异显著 (P=0.05)。

另外通过平板测定透明圈的方法进行解磷菌解磷能力的比较,这是一种简单而方便的定性测定磷细菌的方法。磷细菌在生长过程中分泌一些物质,并向周围扩散,使菌落周围培养基中磷酸盐溶解而呈现透明状。结果表明:ZB0211 菌株的菌落和透明圈平均直径分别为 3.0 ~ 4.2、6.0 ~ 8.0 mm,透明圈与菌落直径之比为 2.0 ~ 2.6;B. atr 菌株的菌落和透明圈平均直径分别为 4.0 ~ 5.0、9.0 ~ 10 mm,透明圈与菌落直径之比为 2.25 ~ 2.00;ZM0609 菌株的菌落直径为 0.1 ~ 0.2 mm,透明圈和菌落大小接近,其它菌株的菌落和透明圈直径之比为 1 ~ 3,该实验结果再次证实,ZB0211 菌株的解磷能力较强。

### 2.3 解磷菌的最适培养条件

2.3.1 最适碳源 碳是构成微生物细胞和代谢产物中碳架来源的重要营养物质,故碳源的选择对微生物培养至关重要。本试验比较了葡萄糖、蔗糖、淀粉 3 种常见碳源对解磷菌 ZB0211 生长的影响,经方差分析可知,不同的碳源对解磷菌的生长影响显著(表 3)。从图 1 中可看出,解磷菌 ZB0211 在碳源为蔗糖的培养基中生长最好,其 OD 值为 1.566,在淀粉为碳源的培养基中生长较差,其 OD 值为 0.496。

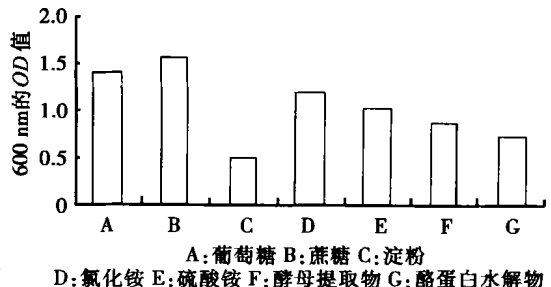


图 1 不同碳源、不同氮源对 ZB0211 菌量的影响

2.3.2 最适氮源 解磷菌在氮源为  $\text{NH}_4\text{Cl}$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、酵母提取物以及酪蛋白水解物的培养基中的生长情况见图1,4种氮源对菌体生长的影响显著(表4)。从图1中可以看出,解磷菌在无机氮源培养基中生长较好,其中在  $\text{NH}_4\text{Cl}$  为氮源的培养基中生长最好,OD 值为 1.2;在有机氮源的培养基中生长较差,其中以酪蛋白水解物为氮源的培养基中生长最差。

表3 不同碳源影响菌量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	方差	F
C源	2.016 9	2	1.008 4	6 450.601 **
重复	0.000 9	6	0.001 6	
总和	2.017 8	8		

表4 不同氮源对菌量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	方差	F
N源	0.475 8	3	0.158 6	44.335 **
重复	0.028 6	8	0.003 6	
总和	0.504 4	11		

2.3.3 最适 NaCl 浓度 由于该解磷菌的宿主植物白骨壤生长在海边沙滩上,生境的特点决定菌株的特性,故试验对培养基中的 NaCl 浓度进行调试,分别设置 6 种浓度,菌体生长结果见图2。6种 NaCl 浓度对菌体影响差异极显著(表5)。从图2中可以看出,当 NaCl 浓度为  $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,解磷菌生长最好,其菌体密度最大;随着 NaCl 浓度增加,菌体密度反而下降。

2.3.4 最适初始 pH 值 不同初始 pH 值条件下对解磷菌 ZB0211 的菌体生长影响的结果见图3,方差分析结果显示,初始 pH 值对菌体影响差异极显著(表6)。从图3可以看出,pH 值为 7.5 时最适合解磷菌的生长,pH 值 8.0 次之,故该解磷菌最适 pH 值较一般细菌高。

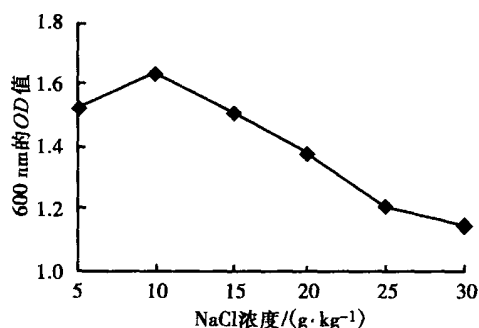


图2 不同 NaCl 浓度对菌量的影响

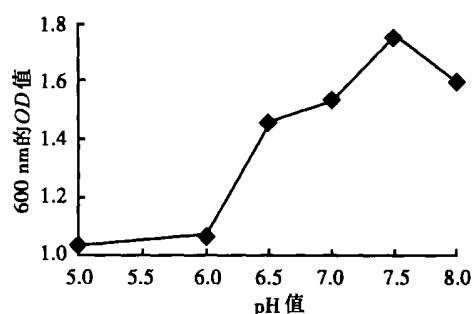


图3 不同初始 pH 值对菌量的影响

表5 不同 NaCl 浓度影响菌量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	方差	F
NaCl	0.545 3	5	0.109 1	7.27 **
重复	0.18	12	0.015	
总和	0.725 3	17		

表6 不同初始 pH 值影响菌量的方差分析

变异来源	平方和	自由度	方差	F
pH	1.291 5	5	0.258 3	31.953 **
重复	0.097	12	0.008 1	
总和	1.388 5	17		

## 2.4 pH 值、菌体数量与解磷能力

pH 值、菌体数量与解磷能力三者之间的动态变化见图4、5。从图4、5看出,B. atr 和 ZB0211 菌株的菌体数量和磷的转化率变化趋势基本一致,菌体数量增多其转化率也增高;但与 pH 值的变化正好相反,pH 值较高时其转化率较低,即酸度降低时其解磷能力提高。普遍认为,解磷菌对难溶无机磷酸盐的解磷机理是菌体生长过程中产生各种有机酸而将其中的磷溶解释放出来,即“酸解作用”。本试验的结果也证实了这一结论,由此可见 pH 值与解磷能力关

系密切。

图 4 B. atr 菌株的解磷能力曲线

图 5 ZB0211 菌株的解磷能力曲线

### 3 讨论

考虑到红树林生活在海岸潮间带,本研究从红树林根际直接分离解磷菌,该方法简便易行,避免过多杂菌,较土壤分离法容易筛选到与植物关系更密切的解磷菌。其它的陆生细菌也可以采用同样的方法分离。林启美等<sup>[6]</sup>从土壤中分离的解磷细菌在以磷矿粉作为唯一的磷源培养 5 d 后,可溶性磷的含量最高可达  $11.73 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。Sundara Rao 等<sup>[7]</sup>把  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  作为磷源,经过 14 d 的摇瓶培养,发现几株芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)释放的可溶性磷含量为  $70.52 \sim 156.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ 。Promd 等<sup>[8]</sup>发现海洋底泥中的磷细菌 *Vibrio* sp. 和 *Pseudomonas* sp. 在它们的对数生长期,可溶性磷的含量为  $0.50 \sim 0.55 \text{ mg L}^{-1}$ 。Craven 等<sup>[9]</sup>报道,分离自海藻(*Zostera marina* L.)根际的 1 株未经鉴定的溶磷细菌的可溶性磷含量高达  $300 \text{ mg L}^{-1}$ 。本试验分离得到解磷能力较强的磷细菌,其可溶性磷含量为  $107 \sim 160 \text{ mg L}^{-1}$ ,为以后进行红树人工林恢复试验提供了优良菌株。在试验过程中还发现,引进菌株在该次试验中的转化率比刚引进时有所下降,Kucey<sup>[10]</sup>也发现在菌株纯化以及传代保存过程中有近 50% 的解磷细菌失去了其解磷能力,因此解磷菌的合理保存以及菌株复壮有待进一步研究。

微生物的解磷机制现在还不完全清楚,但一般认为是由于微生物分泌出有机酸,这些酸既能够降低 pH 值,又可与 Fe、Al、Ca、Mg 等离子结合,从而使难溶性磷酸盐溶解,因此专家认为微生物解磷能力首先取决于微生物本身的特征,如分泌质子、有机酸和其它物质的数量和种类,其次与难溶性磷酸盐的结构和组成成分有关<sup>[11]</sup>。本研究从分离菌株和引进菌株中选取两株优良菌株,通过对它们 pH 值、解磷转化率的动态研究发现,pH 值与解磷量关系密切。赵小蓉等<sup>[12]</sup>发现解磷量与培养液中的 pH 值存在一定的相关性( $r = -0.732$ ),Paul<sup>[13]</sup>同样发现培养液酸碱度的变化与解磷能力之间存在显著相关性。虽然这一结果尚不能肯定是解磷的必要条件,但可以考虑将 pH 值作为筛选菌株时确定产酸高峰期的指标。现有报道认为解磷细菌也是植物生长促生菌,它们在纯培养条件下所释放的磷量相对于植物生长所需还是偏少,但接种解磷菌却能增加植物磷量的吸收,这是由于解磷菌能分泌生长调节物质,促进了根系的生长<sup>[1]</sup>,它们具有解磷和促进生长的双重作用。总之,解磷菌的应用前景巨大,作者将继续在红树林上进行解磷菌的深入研究。

**参考文献:**

- [1] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料,2001(3):7~11
- [2] Bashan Y,Holguin G. Plant growth-promoting bacteria:a potential tool for arid mangrove reforestation[J]. Trees,2002,16:159~166
- [3] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,1985.68~69
- [4] Vazquez P,Holguin G,Puente M E,et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semi-arid coastal lagoon[J]. Biology Fertility of Soils,1999,8:125~146
- [5] 许光辉,郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986.187~189
- [6] 林启美,赵小蓉,孙焱鑫,等. 四种不同生态环境中解磷细菌的数量及种群分布[J]. 土壤与环境,2000,9(1):34~37
- [7] Sundara rao W V B ,Sinha M K. Phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere and soil[J]. India J Agric Sci,1963,33(4):272~278
- [8] Promod K C,Dhevendaran K. Studies on phosphobacteria in Cochin backwater[J].J Mar Biol Ass India. 1987,29:297~305
- [9] Craven P A ,Hayasaka S S. Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacteria in a *Zostera marina* community [J]. Can J Microbiol,1982,28:605~610
- [10] Kucey R M N. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in various cultivated and virgin Alberta soils [J]. Canadian Journal of Soil Science,1983,63:671~678
- [11] 赵小蓉,林启美,李保国. 溶磷菌对4种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究[J]. 微生物学报,2002,42(2):236~241
- [12] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报,2001,28(1):1~4
- [13] Paul N B ,Sundara rao W V B. Phosphate-dissolving bacteria in the rhizosphere of some cultivated legumes[J]. Plant and Soil,1971,35:127~132

**Mangrove PSB :Isolation ,Culture and Phosphate-dissolving Ability**

WAN Lu , KANG Li-hua , LIAO Bao-wen , MA Hai-bing , JIANG Ye-gen

(Research Institute of Tropical Forestry ,CAF ,Guangzhou 510520 ,Guangdong ,China)

**Abstract:**Ten phosphate solubilizing bacterial (PSB) strains were isolated from the mangrove rhizosphere. The culture condition of the selected most effective strain ZB0211 was examined from 4 aspects. The experimental results showed that the optimal carbon and nitrogen sources were respectively sucrose ( $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the optimal concentration of NaCl was 1%, and optimal pH 7.5. The potential relationship among pH level, bacterial growth and phosphate-dissolving ability was also discussed.

**Key words:** mangrove; PSB; isolation; culture condition; phosphate-dissolving ability