

红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、 鉴定及其解磷能力

王 舒, 张林平*, 张 扬, 郝菲菲, 肖金香, 胡冬南

(江西农业大学园林与艺术学院, 江西 南昌 330045)

摘要:研究油茶根际解无机磷细菌的解磷能力对提高红壤丘陵区土壤磷素利用效率具有重要的指导意义。本研究从油茶根际分离筛选出 97 株具有解无机磷能力的菌株, 采用 NBRI-BPB 培养基进行复筛获得 5 株解磷能力较强的解无机磷细菌, 并测定其在 NBRIP 培养基中有效磷含量, 采用形态特征、生理生化、Biolog 系统和 16SrDNA 序列分析鉴定细菌种类, 确定 WB38 为耳假单胞菌 (*Pseudomonas auricularis*), WB39 (WB75) 为杓兰果胶杆菌 (*Pectobacterium cypripedii*), WB53 (WB68) 为路德维希肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*)。研究了解磷菌株 WB38 在不同条件对解磷能力的影响, 结果表明: 不同因子对该菌株解磷能力均有显著影响, 其中温度对其解磷能力影响最大; 该菌株培养的最适碳源和氮源分别为葡萄糖和 NH_4NO_3 ; 解磷细菌 WB38 解磷的最佳培养条件为 $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_1\text{D}_1$, 即温度 28°C , 初始 pH 值 6.5, 接种量 1%, 溶氧量 25 mL。

关键词:油茶; 解磷细菌; 解磷能力; 16SrDNA; Biolog 系统

中图分类号: S794.4

文献标识码: A

Screening, Identification and Phosphate Solubilizing Capability of Phosphate Solubilizing Bacteria in Rhizosphere of *Camellia oleifera* Abel at Red Soil Region

WANG Shu, ZHANG Lin-ping, ZHANG Yang, HAO Fei-fei, XIAO Jin-xiang, HU Dong-nan

(College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

Abstract: The phosphate solubilizing capability of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in rhizosphere of *Camellia oleifera* Abel apparently affects the Phosphorus use efficiency in red soil. 97 phosphate-solubilizing bacterial strains were isolated from the *Camellia oleifera* rhizosphere soil of Hu'nan Province, the high effective PSB were further screened using NBRI-BPB medium, and the molybdenum-anti-spectrophotometric method was applied to determine the phosphate-dissolving ability of the high effective PSB after four days' fermentation in NBRIP medium. The bacteria were identified by their morphological, physiological and biochemical characteristics with Biolog system and 16S rDNA gene sequence analysis. The high effective PSB of WB38, WB39 (WB75), WB53 (WB68) were identified as *Pseudomonas auricularis*, *Pectobacterium cypripedii*, and *Enterobacter ludwigii*, respectively. Experiments were conducted to study the phosphate-solubilizing capability of WB38 under different culture conditions. Every factor has a significant influence on phosphate-solubilizing ability of WB38, and the greatest influence factor on phosphate-solubilizing ability was the temperature. The optimum carbon source and nitrogen source were glucose and NH_4NO_3 . WB38 displayed a better phosphate-solubilizing capability at the temperature of 28°C , the medium initial

收稿日期: 2014-09-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31260194)、江西农业大学博士启动经费(09004155)

作者简介: 王 舒(1989—),女,甘肃张掖人,在读硕士生,主要从事植物有益微生物研究

* 通讯作者: 博士,主要从事森林病理学和大型真菌多样性研究, E-mail: zlping619@163.com

pH was 6.5, the inoculation quantity was 1% and the aeration quantity was 25 mL.

Key words: *Camellia oleifera*; phosphate-solubilizing bacteria; phosphate-solubilizing capability; 16S rDNA; Biolog system

油茶(*Camellia oleifera* Abel)系油茶属茶科,是我国特有的木本油脂食用植物,茶油享有“东方橄榄油”美称。油茶具有保持水土、涵养水源等功能,是抗污染能力极强的树种^[1-3]。油茶主要分布于我国长江流域及以南的红壤区,红壤对磷有强的吸附固定力,土壤磷缺乏和积累问题较为严重^[4-6],土壤中有效态磷不足5%,很难满足植物生长所需^[7],而磷是植物生长的重要物质基础,植物吸收磷量与其生物量呈正相关。因此,如何提高植物对土壤中难溶性磷的吸收具有重要的应用价值。为了获得高产,每年向土壤中施入大量可溶性磷肥,由于土壤固定等作用,当季施入磷肥仅有5%~10%被植物吸收利用,大多数吸附在土壤中的磷易随水土流失迁移至水体,从而导致水体富营养化;且残留在土壤中的磷肥还可以导致土壤板结或重金属污染等严重问题,给生态环境带来很大的负面影响^[8-12]。

许多研究表明,土壤中分布着大量具有解磷能力的微生物,一般将具有溶解难溶性磷酸盐的细菌称为解磷细菌(Phosphate-solubilizing bacteria, PSB)^[13]。这类细菌能够通过自身代谢,将土壤中植物无法吸收的难溶性磷转化为可被植物吸收的可溶性磷,具有溶解无机磷能力,增加植物对磷元素的吸收,进而提高作物产量^[14-15]。因此,如何充分利用解磷微生物来溶解累计于土壤中的磷源、提高磷的利用率,成为攻克这一难题的关键所在。目前,有关解磷微生物的分离、筛选和应用的研究大都集中在农作物,有关多年生林木根际土壤筛选和应用解磷微生物的报道较少,且国内外少见红壤区油茶根际解无机磷细菌的系统研究。

本研究从湖南不同地区油茶根际土的解磷细菌进行了分离筛选,得到了5株高效解磷细菌,采用形态、生理生化、Biolog系统和16SrDNA等方法相结合对其进行菌种鉴定,并对高效解磷菌株WB38的解磷能力以及其解磷能力的影响因素进行研究。该研究结果可为油茶高效生物肥料的研制提供优良菌种资源和理论依据,对提高红壤丘陵区土壤磷素利用效率和促进油茶产业的可持续性发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 培养基

LB液体培养基:胰蛋白胨10g,酵母浸粉5g,NaCl10g,蒸馏水1000mL,pH7.0~7.4。

LB固体培养基:在液体LB培养基中加琼脂16g。

解无机磷细菌筛选培养基(NBRIP)^[16]:葡萄糖10g,Ca₃(PO₄)₂5g,MgCl₂5g,KCl0.2g,MgSO₄·7H₂O0.25g,(NH₄)₂SO₄0.1g,蒸馏水1000mL,pH7.0。

解磷能力测定培养基(NBRI-BPB)^[16]:配方同NBRIP(添加0.025g·L⁻¹的溴酚蓝)。

1.2 油茶根际解无机磷细菌的分离、筛选

采用三点取样法从湖南省林业科学院和浏阳市龙伏镇油茶基地采集油茶10~15cm土层根际土壤,稀释成系列悬浮液,取0.1mL涂布于NBRIP平板上,28℃培养3d,挑取透明圈明显的细菌,纯化3次后,挑取单菌落至LB斜面培养2~3d,并置于4℃保存。

参照Mehta和Nautiyal^[17]的方法(稍作修改)。将分离纯化得到的菌落接种到装有20mLNBRI-BPB培养液的50mL三角瓶中,28℃,180r·min⁻¹培养3d,将发酵液离心10min(4℃,10000r·min⁻¹),600nm下测定上清液的吸光度,并进行解磷能力分级^[18]。分级标准:OD₆₀₀≤-1:解磷能力强(+++);-0.1<OD₆₀₀≤-0.5:较强(++);-0.5<OD₆₀₀≤-0.1:弱(+)。同时以未接种作为对照,每处理重复3次。

1.3 解磷能力测定

选取OD₆₀₀≤-1的菌株,接种于LB液体培养基中,28℃,180r·min⁻¹培养18~24h,作为种子液,并按1%的接种量接种于含20mLNBRI-BPB培养液的100mL三角瓶中,28℃,180r·min⁻¹振荡培养3d,将发酵液离心10min(4℃,10000r·min⁻¹),采用钼锑抗比色法测定上清液中可溶性磷的含量^[19],并按以下计算解磷率^[20],并测定上清液pH值。同时以未接种作为对照,每个处理3个

重复。

解磷率 = (发酵液有效磷含量 - 对照溶液磷含量) × 溶液体积 / 磷酸三钙中含磷总量 × 100%

1.4 菌株鉴定

参照文献^[21]进行形态分类及生理生化分析。并利用 Biolog 进行鉴定(详细的鉴定步骤参照该系统的鉴定说明书)。

参照文献^[22]方法提取细菌的基因组 DNA,采用细菌通用引物(27 f: 5'-AGAGTTTGATC-CTGGCT-CAG-3'; 1492r: 5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3')对基因组 DNA 进行 16SrDNA 片段扩增; 50 μL PCR 反应体系: Mix 25 μL、引物各 2 μL、模板 2 μL、ddH₂O 补足 50 μL。PCR 反应条件: 95℃ 4 min; 95℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 90 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 7 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 送上海生工测序。将测序所得序列在 NCBI 和 EzTaxon 中进行 BLAST 比对分析, 利用软件 MEGA5.0 构建系统发育树(Bootstrap = 1 000)。

1.5 不同因素对解磷能力的影响

选取解磷效果较好的菌株 WB38 进行最佳发酵培养基条件优化。分别选择碳源、氮源、温度、初始 pH、接种量、溶氧量作为影响因素, 参照 1.3 方法对各处理进行解磷能力测定, 筛选出最佳碳氮源种类和最适培养范围。每个处理重复 3 次。单因素试验因素及水平选择如表 1 所示。

表 1 单因素试验因素及水平表

水平	因素					
	碳源	氮源	温度/℃	pH	接种量/%	溶氧量/mL
1	麦麸	KNO ₃	22	5.5	1%	25
2	蔗糖	NH ₄ NO ₃	24	6	2%	50
3	葡萄糖	(NH ₄) ₂ SO ₄	26	6.5	3%	75
4	麦芽糖	尿素	28	7	4%	100
5	甘露醇	牛肉膏	30	7.5	5%	125
6	可溶性淀粉	酵母膏	32	8	6%	150

1.6 正交试验

在单因素试验的基础上, 对温度、初始 pH、接种量和溶氧量四个因素, 采用正交表 L₉(3⁴) 设计实验, 28℃, 180 r · min⁻¹ 培养 4 d, 测定其解磷能力, 优化其最佳发酵培养基。

1.7 数据分析

采用 SPSS V13.0 软件对试验数据进行统计分析, 并采用 Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 解磷菌株的分离、筛选

共分离获得 97 株能产生解磷圈的解无机磷细菌(图 1), 其中湖南省林业科学院 45 株, 浏阳市龙伏镇茶园 52 株。利用 Mehta 和 Nautiyal 的方法对 97 株解无机磷细菌进行定性和半定量解磷能力的测定, 结果表明有 5 株解磷菌株在 NBRI-BPB 培养基中的发酵液 OD₆₀₀ 均小于 -1.1 (表 2), 表明其是具有较大应用潜力的高效解磷细菌, 其所产生的解磷圈外径与菌落生长的直径比值(D/d)都大于 3.78, 其中 WB68 比值最大(5.79), 次之为 WB38(5.67)、WB53(5.04)。

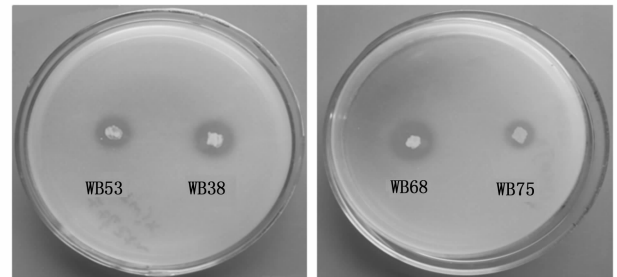


图 1 部分解无机磷细菌菌株在 NBRIP 平板上形成的解磷圈

众多研究表明, 解磷菌的主要解磷机制是产生和释放有机酸, 在降低 pH 值的同时, 又能与 Ca²⁺、Fe²⁺、Al³⁺ 等离子螯合, 从而将难溶磷转化为有效磷。由表 2 可知, 5 株解磷细菌发酵液 OD₆₀₀ 值在 -1.197 ~ -1.963 之间, 表明 5 株解磷细菌分泌了大量有机酸降低了培养介质 pH 值, 并使 BPB 褪色。根据发酵液 OD₆₀₀ 值得不同, 各菌株产酸能力排序为 WB38 > WB75 > WB39 > WB68 > WB53。

2.2 解磷能力测定

由表 2 可知, 初筛获得的 5 株细菌各处理发酵液中有有效磷含量均显著高于对照(54.33 mg · L⁻¹), 且不同处理间差异显著。5 株解磷细菌处理发酵液有效磷含量在 401.56 ~ 475.01 mg · L⁻¹ 之间, 解磷率介于 9.25% ~ 11.88%, 而菌株 WB38 发酵液中的有效磷含量最高(475.01 mg · L⁻¹), 解磷率为 11.88%。

解磷细菌在 NBRIP 液体培养基中摇培 4 d 后, 各处理 pH 值均比对照有不同程度的降低, 介于 3.96 ~ 4.36 之间, 且发酵液 OD₆₀₀ 值与有效磷含量也存在一定相关性。相关性分析表明, 发酵液 pH 值(X)与有效磷含量(Y)呈极显著负相关(R² =

0.920 7^{**}, $P < 0.01$), 线性回归方程为 $Y = -185.65X + 1502.8$; 发酵液 OD_{600} 值 (X) 与有效磷含量 (Y) 呈极显著负相关 ($R^2 = 0.992 8^{**}$, $P < 0.01$), 线性回归方程为 $Y = -98.01X + 583.7$ 。上述

结果表明, 采用 NBRI-BPB 培养液摇配 4 d 后测定发酵液 OD_{600} 值可以相对准确、快速的从大量的供试解磷菌株中筛选出具有解磷能力较强的菌株, 且解磷菌株产生的酸性物质有助于其解磷能力的提高。

表 2 5 株解无机磷细菌的解磷能力测定

菌株号	OD_{600}	D/d	pH	有效磷含量/($mg \cdot L^{-1}$)	解磷率/%
WB38	-1.963 ± 0.04a	5.67	3.960 ± 0.140a	475.01 ± 5.5a	11.88
WB39	-1.473 ± 0.03c	4.87	4.150 ± 0.088ab	430.17 ± 3.2ab	10.69
WB53	-1.197 ± 0.06e	5.04	4.360 ± 0.085bcd	401.56 ± 6.7b	9.93
WB68	-1.363 ± 0.06d	5.79	4.190 ± 0.130abc	413.65 ± 7.5b	9.25
WB75	-1.609 ± 0.02b	3.78	4.080 ± 0.211a	43.45 ± 5.1a	10.04
Ck	0 g	/	7.06 ± 0.020f	54.33 ± 4.3f	/

2.3 菌株鉴定

2.3.1 解磷细菌的形态特征和生理生化特性 对 5 株高效解磷细菌的细胞形态和菌落特征进行观察, 均为革兰氏阴性 (G^-) 短杆菌, 无芽孢, 好氧, 菌落圆形、较小, 边缘整齐, 表明湿润粘稠。除菌株 WB38 的菌落为淡黄色外, 其余菌株均为乳白色。对 5 株解磷细菌的各项生理生化鉴定项目包括: 淀粉水解、明胶液化、硝酸盐还原、柠檬酸盐、接触酶、甲基红、伏普、纤维素水解实验等, 每个处理重复 3 次。实验结果表明, 菌株 WB38 属于假单胞菌属, 菌株 WB39、WB75 属于果胶杆菌属, 菌株 WB53、WB68 属于肠杆菌属 (表 3)。

表 3 5 株高效解磷细菌的生理生化特征

实验项目	WB38	WB39	WB53	WB68	WB75
接触酶试验	+	+	+	+	+
甲基红试验	-	+	+	+	+
伏普试验	+	+	-	-	-
淀粉水解试验	-	-	-	-	+
明胶液化试验	+	+	+	+	+
硝酸盐还原试验	+	-	-	+	-
纤维素水解试验	-	-	-	-	-
柠檬酸盐试验	+	-	+	+	+

2.3.2 解磷细菌的 Biolog 鉴定 5 株高效解磷细菌在 Biolog 鉴定板上培养 16 ~ 24 h 时的读数相似值 (SIM) 均大于 0.5, 符合 Biolog 系统关于理想结果的要求, 确定菌株 WB38 为耳假单胞杆菌 (*P. auricularis*), WB39 和 WB75 为杓兰果胶杆菌 (*P. cyripedii*), WB53 和 WB68 为路德维希果胶杆菌 (*E. rluudwigii*), 该结果与形态特征、生理生化鉴定结果相一致。

2.3.3 16SrDNA 鉴定 将菌株所测的 16SrDNA 序列与 GenBank 及 EzTaxon 近缘种序列进行同源性比对, 运用 ClustalX 进行分析, 利用 MEGA5.0 采用

Neighbor Joining 法构建系统发育树。菌株 WB38、WB39 (WB75)、WB53 (WB68) 分别与假单胞菌属、果胶杆菌属和肠杆菌属具有较高的序列相似性。从图 2 可知, 菌株 WB38、WB39 (WB75)、WB53 (WB68) 分别与 *P. auricularis*、*P. cyripedii*、*E. ludwigii* 的亲缘关系关系较近。因此, 综合 5 株解磷细菌的形态特征、生理生化特性、Biolog 鉴定及系统发育结果, 将 WB38、WB39 (WB75)、WB53 (WB68) 分别准确鉴定为 *P. auricularis*、*P. cyripedii*、*E. ludwigii*。

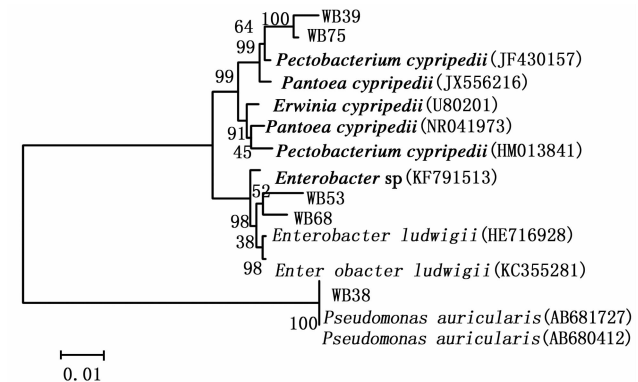


图 2 基于 16s DNA 序列构建的 5 株解磷细菌系统发育树

2.4 不同培养条件对菌株 WB38 解磷能力的影响

2.4.1 碳源、氮源 由图 3 - A 可知, 解磷菌株 WB38 在不同碳源条件下解磷效果差异显著, 6 种碳源培养基的解磷效果依次为葡萄糖 > 甘露醇 > 蔗糖 > 淀粉 > 麦麸 > 麦芽糖, 其中以葡萄糖为碳源时, 有效磷含量为 $364.37 mg \cdot L^{-1}$, 而麦芽糖为碳源时, 有效磷含量仅为葡萄糖的 1/4。主要原因可能是麦芽糖是由含淀粉酶的麦芽作用于淀粉而制得, 而淀粉结构复杂, 使得解磷细菌在代谢利用时较为缓慢, 其解磷能力也相对较差。因此, 该菌最适碳源为葡萄糖。

由图 3 - B 可知, 菌株 WB38 在不同氮源条件下

解磷效果差异较为显著,6种氮源培养基的解磷效果依次为硝酸铵 > 硫酸铵 > 牛肉膏 > 酵母膏 > 硝酸钾

> 尿素,其中以硝酸铵为氮源时,有效磷含量最高(315.11 mg · L⁻¹)。因此,该菌最适氮源为 NH₄NO₃。

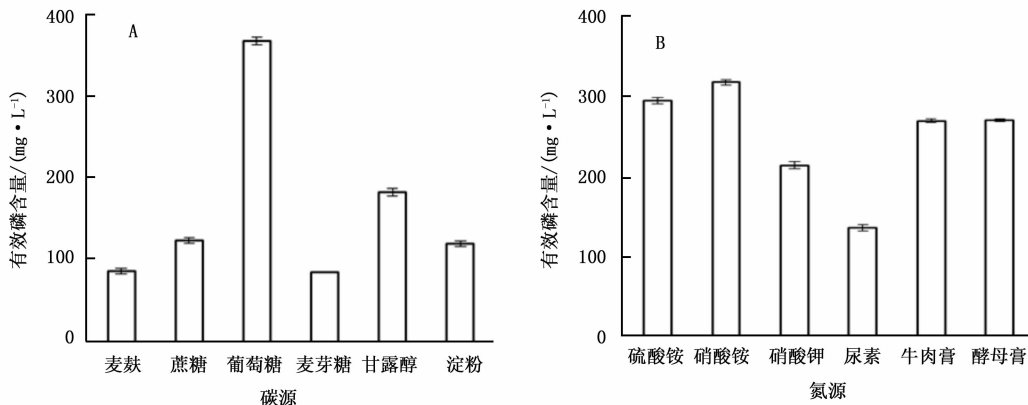


图3 碳源(A)、氮源(B)对菌株 WB38 解磷能力的影响

2.4.2 温度、初始 pH 值、接种量、溶氧量 温度是培养微生物影响重大的因素。一般来说,培养温度升高,酶反应速率增大,代谢速度加快。但酶本身很容易因过热而失活,表现在菌体易衰老,影响最终产量。如图 4 - C 所示,温度在 28℃ 时,其解磷能力最强。确定该解磷细菌的培养温度优化区域为:26℃ ~ 30℃。

pH 值是菌株生长的化学因子,不同梯度的 pH 起始浓度对菌株的生长影响很大,主要原因是 pH 值可以引起细胞膜和营养物质离子度的变化,从而影响菌株对营养物的吸收^[23]。确定适宜的 pH 值,对菌株的解磷效果的提高有重要的意义。如图 4 - D 可知,该菌株在偏酸性环境中培养,其解磷能力较差。确定该解磷细菌的初始 pH 值优化区域为 6.5 ~ 7.5。

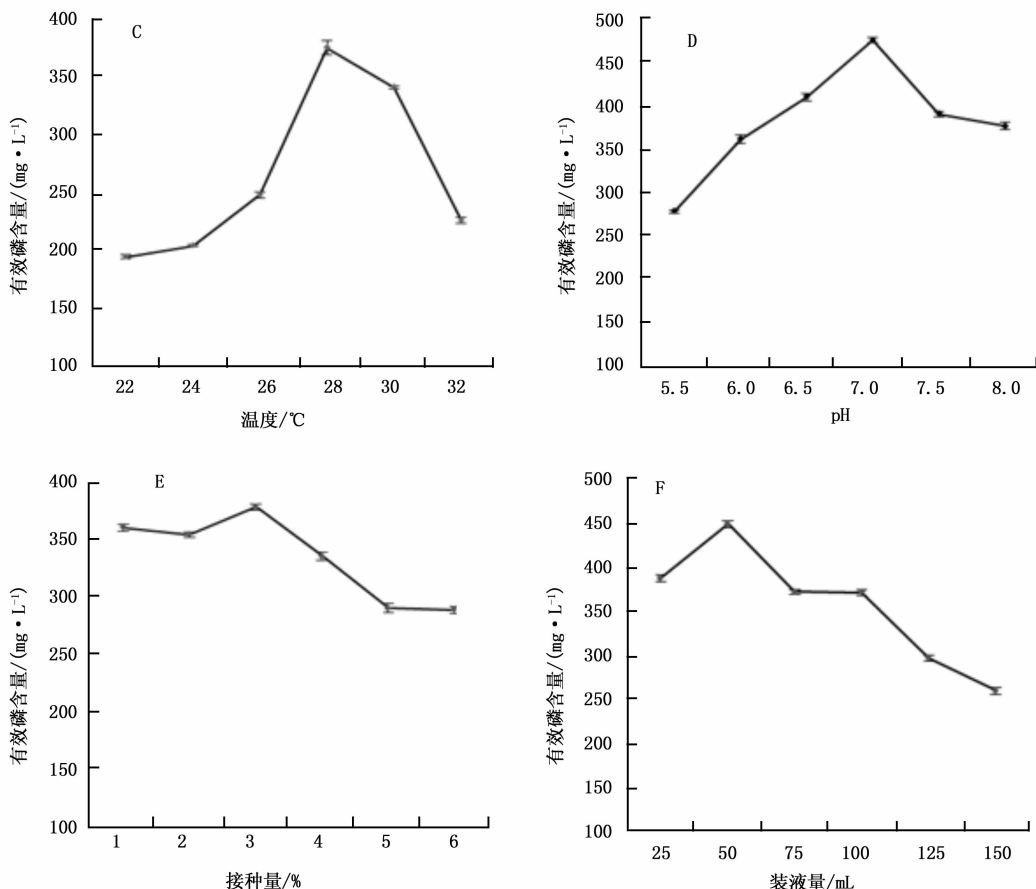


图4 温度(C)、pH 值(D)、接种量(E)、溶氧量(F)对菌株 WB38 解磷能力的影响

接种量的多少直接影响到菌株的生长繁殖速度,接种量过少,菌体生长不够旺盛,影响解磷效率;接种量过多,则会使菌体生长过快,消耗培养基过多,影响发酵后期生长。本实验在 pH 值 7.0 的发酵液中接入对数期的种子液,接入不同的接种量,结果如图 4-E 所示,1%、2%、3% 三个接种浓度对该菌有较好的解磷效果。

微生物的代谢方式会随生长环境中的氧气浓度的变化而变化,直接影响到微生物的生长速率和解磷效果^[24]。由图 4-F 可以看出,当装液量超过 50 mL,解磷能力持续下降,且装液量超过 100 mL 后,解磷效果明显下降。在装液量为 50 mL 时,该菌解磷能力达到最高,且表明该菌株为好养菌株。因此,确定该解磷细菌的溶氧量优化区域为:25 ~ 75 mL。

2.5 正交试验

高效解磷细菌 WB38 解磷培养条件的正交试验结果见表 4。根据 K 值和极差 R 大小可知,各因素对解磷效果影响的主次顺序为 A > B > D > C,即温度 > 初始 pH 值 > 溶氧量 > 接种量,各因素对其解磷能力的影响都为极显著 ($P < 0.01$),其中温度是影响解磷能力的主要因素,其次是 pH 值。综合正交试验结果与方差分析表明(表 5),本实验解磷细菌

表 4 解磷细菌 WB38 的 $L_9(3^4)$ 正交设计方案及试验结果

试验号	因素及水平				试验结果 有效磷 含量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
	温度/ ℃ A	初始 pH 值 B	接种量/ % C	溶氧量/ mL D	
1	1	1	1	1	345.79
2	1	2	2	2	100.64
3	1	3	3	3	123.65
4	2	1	2	3	336.94
5	2	2	3	1	417.47
6	2	3	1	2	386.50
7	3	1	3	2	367.03
8	3	2	1	3	150.20
9	3	3	2	1	337.82
K_1	570.08	1 049.75	882.48	1 001.08	
K_2	1 040.90	568.31	775.40	854.16	
K_3	855.05	847.97	808.15	610.79	
k_1	190.03	* 349.92	* 294.16	* 333.69	
k_2	* 346.97	189.44	258.47	284.72	
k_3	285.02	282.66	269.38	203.60	
R	156.94	160.48	35.70	130.10	
最优水平	2	1	1	1	
主次顺序	A > B > D > C				

注:表 2 中 K_1 、 K_2 、 K_3 分别为 3 种处理水平的总值; k_1 、 k_2 、 k_3 为平均值;R 是极差。* 表示在几个处理当中所得的最大平均值。

菌 WB38 的最佳解磷条件为 $A_2B_1C_1D_1$,即温度 28°C ,初始 pH 值 6.5,接种量 1%,溶氧量 25 mL。因此,在此最优条件下进行验证试验,发酵液中有效磷含量达到 $520.96 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,高于所有试验组,表明优化的结果可靠。

表 5 正交结果方差分析

方差来源	平方和	自由度	均方	F	显著性
A(温度)	0.213	2	0.107	2 204.66	**
B(pH)	0.072	2	0.036	745.62	**
C(接种量)	0.013	2	0.007	135.08	**
D(溶氧量)	0.008	2	0.004	83.74	**

3 结论与讨论

(1) 众多研究表明,芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、伯克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)等是多年生林木(毛竹、桉树、红树林、红豆杉、松林等)根际土壤中的优势解磷细菌,而且也是较常见的解磷细菌^[18,25-26]。本研究从红壤区油茶根际土壤中分离得到 5 株高效解无机磷细菌,通过形态特征、生理生化、Biolog 系统和 16SrDNA 对菌株进行鉴定,确定菌株 WB38 为耳假单胞菌(*Pseudomonas auricularis*),WB39(WB75)为杓兰果胶杆菌(*Pectobacterium cypripedii*),WB53(WB68)为路德维希肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)。此外,本研究分离得到的果胶杆菌属作为解磷细菌少有报道,丰富了解磷微生物的种类资源。

(2) 从解磷能力上看,本研究筛选得到的 5 株解磷细菌在 NBRI-BPB 液体培养基中培养 4 d 的有效磷含量在 $401.56 \sim 475.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间,是对照组 ($54.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 8 倍多。任嘉红^[18]从南方红豆杉根际土壤筛选出的几株高效解磷细菌的解磷能力较好,有效磷含量可高达 $647.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,本研究分离得出的菌株解磷能力稍弱。陈俊等^[27]在研究红树林根际土壤中筛选出具有溶解磷酸三钙的解磷细菌 HN3-2,其解磷能力为 $90.95 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,有效磷含量低于本研究。刘聪^[28]等从黑土区 4 种林地(美青杨林、水曲柳林、落叶松林和樟子松林)土壤中分离得到 2 株高效解无机磷细菌,其有效磷含量远低于本研究。结果表明,本研究筛选出的菌株有较好的解磷能力。但本研究是以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为唯一无机磷源,在今后的研究中可以增加无机磷源的种类,如 AlPO_4 、 $\text{FePO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 等,更好的筛选出具有溶解多种难溶性磷酸盐的菌株,进而提高解磷菌

株的质量和解磷能力。

(3)关于解磷细菌的解磷机制有较多观点,最为常见的一种观点认为解磷细菌可产生大量低分子量有机酸,使难溶性磷酸盐在酸性条件下被溶解,致使发酵液中的有效磷含量不断增加。本研究发现解磷细菌在培养过程中,均产生较大的解磷圈,表现出较强的解磷能力,解磷细菌的有效磷含量与培养液的pH值存在显著的负相关关系,这与刘雪红^[29]、易艳梅^[30]、贺梦醒^[31]等研究结果一致,但与Nersha^[32]、Thomas^[33]、杨慧^[34]等的研究结果相悖。主要原因可能是:①不同种类解磷细菌的解磷机制不尽相同;②不同解磷细菌分泌的有机酸种类及总数量差异很大,而不同类型的难溶性磷酸盐对这些有机酸的释磷作用敏感性不同。解磷细菌的解磷机制有待进一步研究探讨。

(4)本研究对影响高效解磷菌株WB38(*Pseudomonas auricularis*)解磷效果的不同培养条件进行了探讨,发现该菌株在不同培养条件下表现出的解磷能力差异显著。在菌株WB38解磷效果的影响因素中,温度对菌株WB38的解磷能力影响最大;不同碳源对菌株WB38解磷能力影响很大,其原因可能与糖类不同结构有关,菌体更适宜利用某种结构,需要的酶越少,过程越简单,从而更容易产酸^[23];不同氮源对该菌株的解磷能力影响也较大,氮源为硝酸铵时解磷能力最高,而为尿素时解磷能力很差。Illmer在研究氮源对解磷微生物解磷效果中表明铵态氮是解磷微生物的必要氮源,甚至对铵态氮具有一定的依赖性^[35]。由正交试验结果与方差分析可知,解磷菌株WB38最适碳源和氮源分别为葡萄糖和 NH_4NO_3 ,且最佳培养条件为 $\text{A}_2\text{B}_1\text{C}_1\text{D}_1$,即温度 28°C ,初始pH值6.5,接种量1%,溶氧量25 mL。在本研究基础上,将进一步研究解磷菌株WB38对油茶的接种效应及其促生机制,为红壤区油茶专用解磷细菌肥料的研制奠定基础,对促进油茶产业的可持续性发展具有重要意义。

参考文献:

[1] 何方,何柏. 油茶栽培分布与立地分类的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(5): 64-72.

[2] 沈天亮,焦如珍. 细菌肥料对油茶幼林生长的影响[J]. 林业科学研究, 2014, 27(4): 570-574.

[3] 王斌,王开良,童杰洁,等. 我国油茶产业现状及发展对策[J]. 林业科技开发, 2011, 2: 11-15.

[4] 赵其国,黄国勤,马艳芹. 中国南方红壤生态系统面临的问题

及对策[J]. 生态学报, 2013, 33(24): 7615-7622.

[5] 孙波,张桃林,赵其国. 南方红壤丘陵地区土壤养分贫瘠化的综合评价[J]. 土壤, 1995, 27(3): 119-128.

[6] 胡月明,欧阳村香,戴军,等. 我国红壤资源农业利用研究进展. 土壤与环境, 1999, 8(1): 53-57.

[7] 赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料, 2001, 5(3): 7-11.

[8] Abd-Alla M H. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by Rhizobium leguminosarum biovar viceae. [J]. Letters in Applied Microbiology, 1994, 18(5): 294-296.

[9] 谢林花,吕家珑,张一平,等. 长期施肥对石灰性土壤磷素肥力的影响 I. 有机质、全磷和速效磷[J]. 应用生态学报, 2004, 15(5): 787-789.

[10] 朱培森,杨兴明,徐阳春,等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112.

[11] 盛荣,肖和艾,谭周进,等. 土壤解磷微生物及其磷素有效性转化机理研究进展[J]. 土壤通报, 2010, 41(6): 1505-1510.

[12] 孙珊,黄星,范宁杰,等. 一株溶磷细菌的分离、鉴定及其溶磷特性研究[J]. 土壤, 2010, 42(1): 117-122.

[13] Chung H, Park M, Madhaiyan M, et al. Isolation and characterization of phosphatesolubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37: 1970-1974.

[14] Peix A, Rivas-Boyer AA, Mateos PF, et al. Growth promotion of chickpea and barely by a phosphate solubilizing strain of Mesorhizobium mediterraneum under growth chamber conditions [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2001, 33: 103-110.

[15] Zaidi A, Khan MS, Amil M. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (Cicerarietinum L.) [J]. European Journal of Agronomy, 2003, 19: 15-21.

[16] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法(第一版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2000, 26: 147-159.

[17] Mehta S, Nautiyal C S. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria [J]. Current microbiology, 2001, 43(1): 51-56.

[18] 任嘉红,刘辉,吴晓惠,等. 南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学报, 2012, 53(3): 295-303.

[19] Kundu B S, Nehra K, Yadav R, et al. Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana [J]. Indian journal of microbiology, 2009, 49(2): 120-127.

[20] 李娟,王文丽,卢秉林,等. 甘肃省河西高钙土溶磷菌筛选及其溶磷能力初步研究[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(2): 8-9.

[21] Buchana RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所译. 北京:科学出版社, 1984.

[22] Sambrook J, Fritsch ED, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New

- York. 2001.
- [23] 胡子全, 赵海泉. 一株有机解磷菌的筛选及其最佳生长条件的研究[J]. 中国给水排水, 2007, 23 (17): 66 - 70.
- [24] 王金玲, 刘晓平, 赵凤艳, 等. 解磷巨大芽孢杆菌液体发酵培养条件的优化[J]. 中国农学通报, 2013, 29(15): 68 - 72.
- [25] 韩 烁, 夏冬亮, 李潞滨, 等. 毛竹根部解磷细菌的筛选及多样性研究[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(2): 26 - 31.
- [26] 王岳坤, 于 飞, 唐朝荣. 海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 64 - 71.
- [27] 陈 俊, 陆俊锬, 康丽华, 等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1183 - 1188.
- [28] 刘 聪, 林 维, 孙 珑, 等. 黑土区林地土壤高效解磷细菌的分离、筛选及其解磷效果[J]. 东北林业大学学报, 2013, 41 (11): 83 - 85 + 122.
- [29] 刘雪红, 张丽燕, 范延辉, 等. 沾化冬枣根际解无机磷细菌的分离、鉴定及其在土壤中溶磷效果的研究[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 204 - 209.
- [30] 易艳梅, 黄为一. 产多糖溶磷细菌对难溶性 Ca - P 的活化特性[J]. 南京农业大学学报, 2008, 31(2): 49 - 54.
- [31] 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.
- [32] Narsha N, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biochemistry, 2000, 32: 559 - 565.
- [33] Thomas G V. Occurrence and ability of phosphate solubilizing fungi from coconut plant soils [J]. Plant and Soil, 1985, 87: 357 - 364.
- [34] 杨 慧, 范丙全, 龚明波, 等. 一株新的溶磷草生欧文氏菌的分离、鉴定及其溶磷效果的初步研究[J]. 微生物学报, 2008, 48 (1): 51 - 56.
- [35] Illmer P. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms [J]. Soil Biol. Biochem, 1995, 27 (3): 257 - 263.