



武志海, 孙合美, 杨美英, 等. 水稻根际土壤溶磷菌的分离、鉴定及对水稻的促生作用[J]. 华南农业大学学报, 2017, 38(1): 50-57.

水稻根际土壤溶磷菌的分离、鉴定 及对水稻的促生作用

武志海^{1†}, 孙合美^{2†}, 杨美英², 卢冬雪², 岳胜天², 付 丽²

(1 吉林农业大学 农学院, 吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】为明确水稻根际溶磷菌株溶磷能力及其对水稻植株及根际土壤磷含量的影响。【方法】利用溶磷圈法从水稻根际土壤中分离获得具有较强溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 能力的 2 株细菌 NDW1 和 NDW3, 根据 16S rDNA 对菌株进行鉴定。以 NBRIP 为基础培养基, 通过正交试验对 2 株菌株利用氮源、碳源及初始 pH 进行优化, 鉴定菌株的吲哚乙酸 (IAA) 分泌量, 研究溶磷菌对水稻的促生作用, 以及对土壤速效磷和水稻幼苗全磷含量的影响。【结果】菌株 NDW1 和菌株 NDW3 分别被鉴定为 *Enterobacter* sp. 和 *Serratia* sp., 2 株菌株溶磷的最佳条件组合均为葡萄糖、蛋白胨及初始 pH 6。2 株菌株 24 h 内最高溶磷量分别为 294.95 和 312.93 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 且都可分泌 IAA。土培和沙培条件下, 溶磷菌 NDW3 对水稻株高、根长、最大叶长及地上干质量都有明显的促进作用, 并且 NDW3 在 2 种植物条件下均显著增加了根际土壤速效磷及水稻植株全磷含量。【结论】从水稻根际土壤分离获得 2 株溶磷能力较好的细菌菌株 *Enterobacter* sp. NDW1 和 *Serratia* sp. NDW3, 菌株 NDW3 对水稻的促生作用强于菌株 NDW1。

关键词: 土壤溶磷菌; IAA; 促生作用; 磷含量; 水稻; 根际

中图分类号: S565.101

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2017)01-0050-08

Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria from rice rhizosphere soil, and promoting effect on rice plant growth

WU Zhihai^{1†}, SUN Hemei^{2†}, YANG Meiyong², LU Dongxue², YUE Shengtian², FU Li²

(1 Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;

2 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract:【Objective】To determine the ability of phosphate dissolving of phosphate solubilizing bacteria (PSB) in rice rhizosphere, and study the effect of PSB on soluble phosphorus contents in rice plants and rhizosphere soil. 【Method】Two bacteria strains NDW1 and NDW3 with strong ability of dissolving $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ were isolated from rice rhizosphere soil based on the halo zone formation on media due to phosphate solubilization, and identified by 16S rDNA method. Phosphorus dissolving conditions of two strains were optimized by orthogonal test with NBRIP as the basic medium. The production of indole-3-acetic acid (IAA) were determined. The effects of NDW1 and NDW3 on promotion of rice growth, the soil available phosphorus contents and plant total phosphorus contents were studied. 【Result】NDW1 and NDW3 were identified as *Enterobacter* sp. and *Serratia* sp.. The best combination of carbon, nitrogen source and pH for phosphate solubilization by NDW1 and NDW3 were both the combination of glucose,

收稿日期: 2016-03-14 优先出版时间: 2016-12-28

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20161228.0937.038.html>

作者简介: 武志海 (1975—), 男, 副教授, 博士, E-mail: wuzhihai1116@163.com; 孙合美 (1988—), 女, 硕士, E-mail: 602132215@qq.com, †表示对本文贡献相同; 通信作者: 杨美英 (1974—), 女, 副教授, 博士, E-mail: jlaumeiyong@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31201687)

peptone and pH 6. The highest phosphorus contents dissolved by NDW1 and NDW3 were 294.95 and 312.93 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ after 24 h incubation, respectively. Both PSB could produce IAA. NDW3 significantly increased the shoot height, root length, maximum leaf length and above-ground dry mass of rice plant in both soil culture and sand culture. NDW3 also significantly increased the contents of soil available phosphorus and rice total phosphorus under both culture conditions. 【Conclusion】*Enterobacter* sp. NDW1 and *Serratia* sp. NDW3 isolated from rice rhizosphere soil have strong ability of phosphate dissolving. The growth promoting effect of NDW3 for rice plant is better than that of NDW1.

Key words: soil phosphate solubilizing bacteria; IAA; growth promoting effect; phosphorus content; rice; rhizosphere

磷是作物所必需的大量营养元素,在光合作用、能量转移、信号转导及大分子物质的生物合成几大代谢中都起着关键作用^[1]。我国有74%的耕地土壤缺磷^[2],可溶性磷肥施入农田后,由于土壤的固定等作用,大部分迅速转变为作物难以吸收的无效磷,导致作物对施入磷肥的当季利用率不超过30%^[3-4]。土壤中溶磷微生物能依靠自身的代谢产物或与其他生物协同作用^[5],将难溶性磷转变成植物可吸收利用的磷形式,能显著提高土壤中有效磷的含量,减少土壤对磷酸盐的吸附固定,被公认为能够安全、高效地活化土壤难溶磷。Hariprasad等^[6]研究发现,接种溶磷菌剂,可增加作物的鲜质量、干质量、株高、根长以及吸收磷量和根际土壤有效磷含量。冯瑞章等^[7]研究表明,接种溶磷菌能显著提高燕麦地上部分和地下部分生物量,可促进植株氮、磷的吸收。但研究发现分离筛选获得的溶磷微生物在实验室条件下都具有较好的溶磷效果,但将它们接入土壤后则溶磷作用减弱甚至消失^[8]。因此,筛选具有高效、稳定溶磷能力的溶磷菌具有重要的意义。

溶磷菌在不同土壤类型、不同作物根际及不同土壤环境条件下的分布有所不同,其群落结构较为复杂^[9]。小麦根际溶磷菌主要为洋葱假单胞菌属 *Pseudomonas cepacia* 和埃希氏菌属 *Escherichia*^[10];玉米根际溶磷微生物主要是欧文氏菌属 *Erwinia*^[11-12];大豆根际主要为假单胞菌属 *Pseudomonas*、不动杆菌 *Acinetobacter pittii* strain 和克雷伯氏菌属 *Klebsiella*^[13-14]。水稻由于长期处于水环境下,其根际溶磷菌与其他作物根际表现不同,有研究表明主要为芽孢杆菌属 *Bacillus* 和土壤单胞菌属 *Agromonas*^[15]。本试验从吉林省水稻种植区采样,分离筛选获得2株具有明显溶磷酸盐能力的菌株,对2株菌株溶磷能力及其对水稻植株和根际土壤磷含量的影响进行了研究,旨在为明确吉林省生态条件下水稻根际优势溶磷菌的分布提供数据支持,为生物

菌肥的研制提供优良菌株。

1 材料与方 法

1.1 供试土壤、培养基及营养液

1.1.1 供试土壤 从吉林农业大学水稻试验田(43°53'N, 125°10'E)采集水稻根际土壤,用塑料袋装好密封带回,放置4℃冰箱保存。盆栽试验供试土壤采自吉林农业大学水稻试验田,土壤基本农化性质为:有机质质量分数为2.21%,有效氮147 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效磷19 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,速效钾75 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。将细沙过2 mm筛子,用清水将细沙上的土洗净,之后用质量分数为1%的盐酸浸泡24 h,再用清水洗细沙直到呈中性,放在干燥箱中烘干,并在烘箱中160℃灭菌4 h备用。

1.1.2 培养基 基础培养基(LB):蛋白胨10 g,酵母浸提液5 g,NaCl 10 g,去离子水1 000 mL,pH 7.2~7.4,121℃灭菌20 min。无机磷基础培养基:采用国际植物研究所磷酸盐生长培养基(NBRIP),其成分为:葡萄糖10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, MgCl_2 5 g, MgSO_4 0.25 g, KCl 0.2 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g,蒸馏水1 000 mL,pH 7.0,115℃灭菌30 min。

1.1.3 营养液 营养液参照国际水稻研究所(IRRI)水稻营养液配方配制^[16]: K_2SO_4 、 CaCl_2 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4NO_3 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、Fe-EDTA 和 NaSiO_3 分别为0.32、0.5、0.16、0.715、0.83、0.036和0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, MnCl_2 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CuSO_4 、 H_3BO_3 和 H_2MoO_4 分别为4.55、0.077、0.078、25和0.263 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 溶磷菌菌株的分离和鉴定

1.2.1 溶磷菌的分离纯化 用灭菌小刀将附着在水稻根表面的土壤刮下。取1 g土置于装有50 mL无菌水的三角瓶中振荡1 h,之后静置10 min。然后取1 mL上清液经梯度稀释后涂布于固体NBRIP培养基上置于30℃条件下培养3 d后计数,然后挑取

不同形态的、具有溶磷圈的单菌落,于 NBRIP 培养基上划线纯化;纯化 3 次,直至无杂菌长出。纯化后的菌株接入液体 NBRIP 培养基、于 30 °C 下振荡培养,至对数期后进行菌种保存及后续试验。

1.2.2 溶磷菌的溶磷圈鉴定 对筛选得到的 2 株细菌分别用接种环挑取单菌落均匀涂到 NBRIP 固体培养基平板中间,在 30 °C 下培养 7 d,观察每个菌株的溶磷圈的情况,测量并拍照。

1.2.3 溶磷菌总 DNA 提取及 16S rDNA 序列分析
利用 LB 液体培养基培养细菌,离心后收集菌体,细菌 DNA 的提取参照文献[17]进行。利用 16S rDNA 的 PCR 反应通用引物^[18](上游引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'; 下游引物为 1492R: 5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系(50 μ L): EasyTaq buffer 5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTPs 4 μ L, 20 μ mol \cdot L⁻¹引物各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L, EasyTaq 酶 0.3 μ L,用无菌水补足至 50 μ L 体积。PCR 反应条件为:98 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 45 s,55 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 120 s,进行 30 个循环;72 °C 延伸 8 min。PCR 产物送至上海生工生物公司测序。利用 Blast 软件在 GenBank 中与其他 16S rDNA 序列进行同源性比较,选择相似性较高的序列利用 MEGA 5.0 软件构建菌株的 16S rDNA 系统树。

1.3 溶磷菌的溶磷条件优化

1.3.1 单因素试验 以 NBRIP 培养基为基础,对不同碳源(葡萄糖、 α -乳糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖)、氮源(硫酸铵、硝酸铵、牛肉膏、蛋白胨、尿素)及初始 pH(5、6、7、8、9)进行单因子试验。液体培养基 100 mL 分装在 250 mL 三角瓶中备用。挑取溶磷菌单菌落接种于 5 mL LB 培养基中, $D_{600\text{nm}}=0.5$ 时以 φ 为 0.5% 接种至液体培养基中,以接种无菌水的培养基作对照,30 °C,150 r \cdot min⁻¹ 摇床培养 4 d,每隔 12 h 取样 1 次,测定培养基上清液中可溶性磷含量,3 次重复,确定较优的碳源、氮源及初始 pH。

1.3.2 正交试验 选择菌株生长及溶磷量增加最显著的时间(24 h)进行碳源、氮源及初始 pH 的正交试验,重复 3 次。

1.3.3 溶磷量测定 吸取 2 mL 菌液,10 000 r \cdot min⁻¹、4 °C 离心 10 min,钼蓝比色法测定其含磷量,计算供试菌株的溶磷量。

1.4 菌株产 IAA 的鉴定及植物促生试验

1.4.1 菌株产 IAA 的鉴定 参照文献[19]的方法。

1.4.2 水稻种子处理及溶磷菌菌液的制备 水稻种子吉农大 809 由吉林农业大学水稻研究所提供,

选择籽粒饱满均匀的种子浸种 2 d,然后用 φ 为 75% 的乙醇溶液处理 2 min,再用 30 g \cdot L⁻¹ 的次氯酸钠表面灭菌 10 min,用无菌水反复冲洗后,将种子放于装有湿润滤纸的无菌平板上 37 °C 倒置催芽 12 h,待露白后 30 °C 催芽 12 h 备用。

溶磷菌菌液的制备:挑取溶磷菌单菌落接种于 5 mL 液体 LB 培养基中过夜培养,以 φ 为 0.5% 接种于 100 mL 液体 LB 培养基中,置于摇床,30 °C,150 r \cdot min⁻¹ 条件下进行培养,待菌液 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.6~0.8 时,将菌液稀释成 10⁸ cfu \cdot mL⁻¹ 菌悬液备用。

1.4.3 盆栽试验 盆栽试验分沙培和土培,参照文献[20]的方法进行。沙培设置 2 个对照:CK1[不加 Ca₃(PO₄)₂;加全磷营养液],CK2[加 Ca₃(PO₄)₂ 和无磷营养液]。2 个处理:加 Ca₃(PO₄)₂ 和无磷营养液、接种菌株 NDW1;加 Ca₃(PO₄)₂ 和无磷营养液、接种菌株 NDW3。土培设置 2 个对照:CK1[不加 Ca₃(PO₄)₂],CK2[加 Ca₃(PO₄)₂]。2 个处理:加 Ca₃(PO₄)₂、接种菌株 NDW1;加 Ca₃(PO₄)₂、接种菌株 NDW3。Ca₃(PO₄)₂ 与灭菌河沙(或稻田土壤)以 φ 为 0.12% 的比例充分混合后装盆备用。每个塑料盆钵(12 cm \times 12 cm)装灭菌河沙 1 000 g、稻田土壤 600 g,每盆种植水稻苗 10 株,每粒发芽水稻种子下加入 10⁸ cfu 溶磷菌,重复 5 次。置培养箱培养,光照 16 h,28 °C,黑暗 8 h,25 °C,沙培水稻苗用不含可溶性磷的水稻营养液进行浇灌,土培水稻苗用自来水浇灌。在水稻生长 20 d 后测定水稻生物量及各指标含量。

1.4.4 指标测定 株高、叶长、根长采用直接测量法。植株生物量测定方法为:将鲜样在 105 °C 下杀青 30 min,75 °C 烘干至恒质量后称其干质量。

1.5 土壤速效磷和植物全磷测定

称取风干后的土样和沙样 5 g,放入 50 mL 三角瓶中,用 Olsen 法^[21]测定土壤速效磷。植株全磷测定方法为 H₂SO₄-H₂O₂ 消煮-钒钼黄比色法^[22]。

1.6 数据分析与处理

数据采用 DPS 7.5 及 Microsoft Office Excel 2003,利用 Duncan's 新复极差法进行多重比较,取数据平均值和标准差用于结果分析。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌的分离与鉴定

从水稻根际土壤中,经多次分离纯化获得具有较强溶解 Ca₃(PO₄)₂ 能力的 2 株细菌,命名为 NDW1、NDW3。2 株溶磷菌在 NBRIP 培养基上产生明显的溶磷圈,如图 1 所示。为了进一步明确溶磷

菌株的特性,分别提取了2株菌株的基因组DNA,进行16S rDNA鉴定。选取 *Acinetobacter* sp.、*Burkholderia* sp.、*Enterobacter* sp.、*Klebsiella* sp.、*Pseudomonas* sp.和 *Serratia* sp.等菌属的16S rDNA序列,利用Bioedit软件进行核酸序列比对,利用MEGA 5.0的Neighbour-joining (NJ)以Maxium Composite Likelihood模型构建进化树,Bootstrap值为1000,结果见图2。从图2可以看出菌株NDW1与 *Enterobacter* sp. E20(基因登录号为:CP012999.1)形成一个分支且支持率为96%,初步鉴定菌株NDW1为 *Enterobacter* sp.。菌株NDW3与 *Serratia marcescens* strain B3R3(基因登录号为:CP013046.1)聚在一个分支且支持率为77%,初步鉴定菌株NDW3为 *Serratia* sp.。

2.2 溶磷菌的溶磷条件优化

2.2.1 菌株溶磷的单因素试验 为了明确不同的碳源、氮源及初始pH对两菌株溶磷的影响,每个因素设置5个水平,测定了96h内不同单因素水平下各菌株的溶磷量。各种碳源条件下,菌株NDW1和NDW3的溶磷特点如图3A和3B所示,2个菌株在以葡萄糖为碳源时,24h溶磷量均达到最高,且72h内溶磷效果要明显优于其他4种碳源,2个菌株在24h后的生长变得缓慢。菌株NDW1和NDW3在以

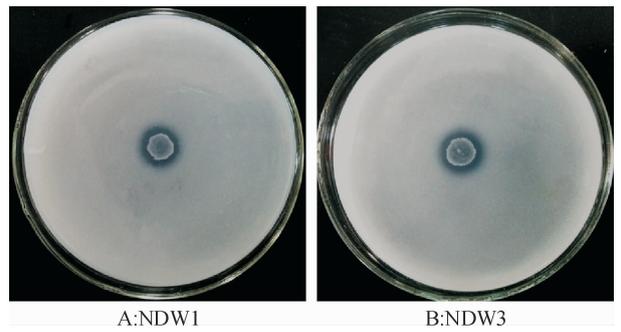


图1 菌株NDW1和NDW3溶磷效果

Fig. 1 Phosphate solubilizing effects of bacteria NDW1 and NDW3

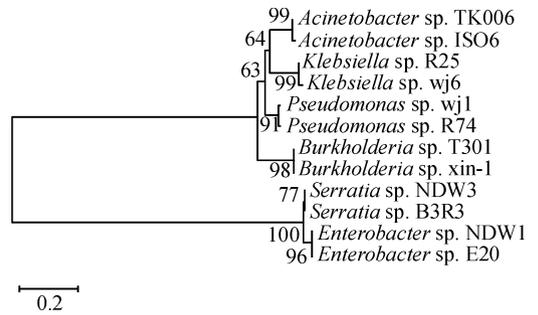
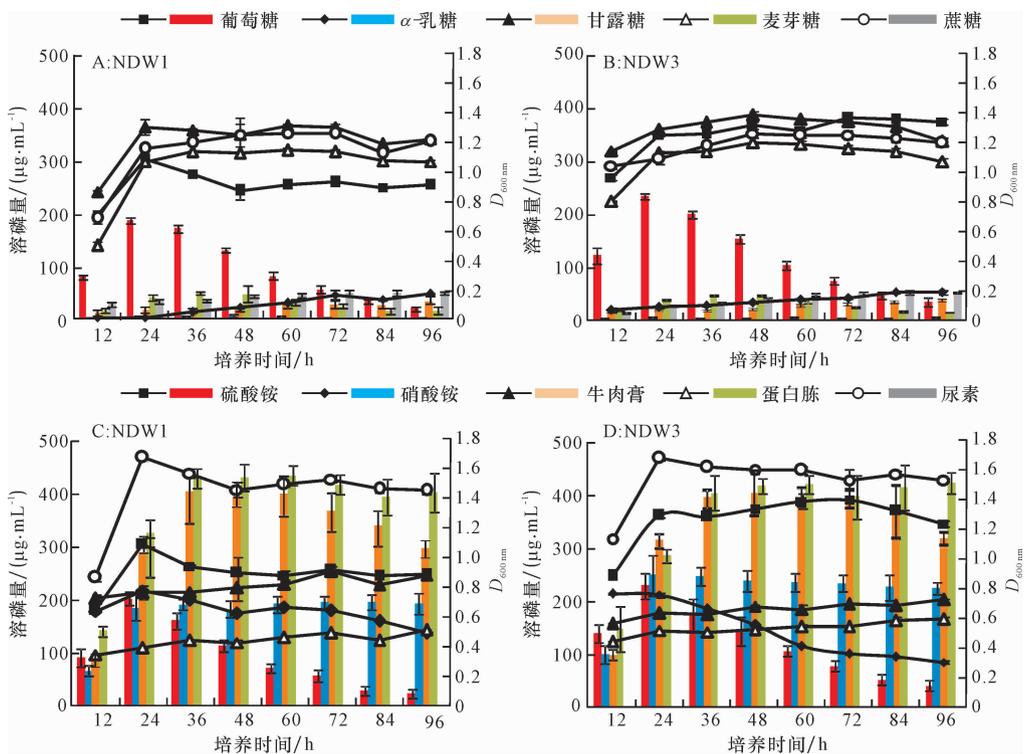


图2 基于菌株NDW1、NDW3和其他溶磷菌16S rDNA序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogeny tree of 16S rDNA sequences from NDW1, NDW3 and other phosphate solubilizing strains



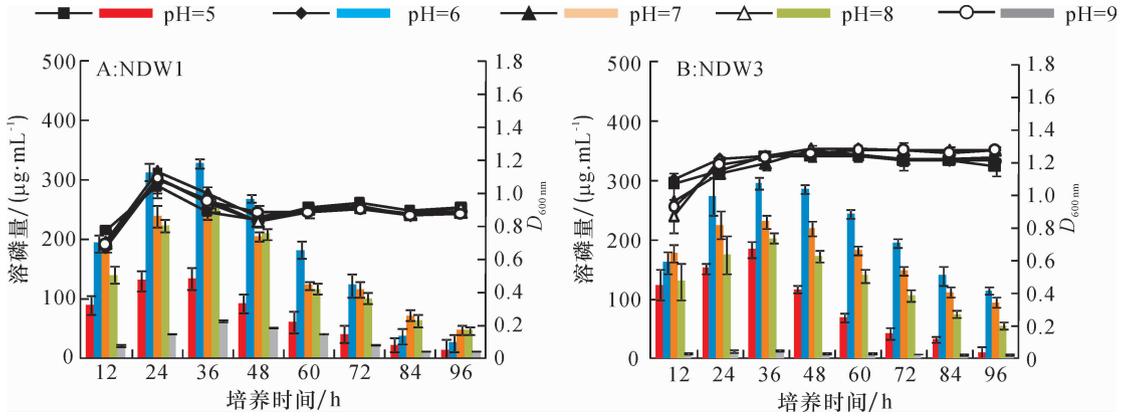
柱状图为菌株溶磷量,折线图为菌液光密度。

图3 不同碳源、氮源对菌株溶磷量和生长的影响

Fig. 3 Effect of different carbon sources and nitrogen sources on phosphorus contents dissolved by bacteria strains and bacterial growth

尿素为氮源时溶磷量为0。在以牛肉膏和蛋白胨为氮源时溶磷量明显高于硫酸铵和硝酸铵,蛋白胨优于牛肉膏,且36 h后都能维持较高的溶磷量(图3C, 3D)。氮源对菌株生长量的影响较明显,尿素和硫酸铵条件下生长都要好于其他氮源。在初始 pH 5~9

的培养基中,菌株 NDW1 都具有一定的溶磷量, NDW3 在初始 pH 9 时溶磷量接近0,2株菌株在初始 pH 6 时溶磷量均较高,且36 h 时达到最大值。5个初始 pH 对2株菌株生长影响不明显。



柱状图为菌株溶磷量,折线图为菌液光密度。

图4 不同 pH 对菌株溶磷量和生长的影响

Fig.4 Effect of different pH values on phosphorus contents dissolved by bacteria strains and bacterial growth

2.2.2 菌株溶磷的正交试验 根据单因素水平试验结果,分别选择3个碳源(葡萄糖、麦芽糖、蔗糖)、氮源(牛肉膏、蛋白胨、硝酸铵)及初始 pH(5、6、7)进行正交试验。结果(表1)表明,在各因素之间,按照对溶磷水平的影响表现为碳源 > 初始 pH > 氮源。正交试验方差分析结果表明,碳源对 NDW1 菌株溶

磷的影响达到显著水平 ($F = 39.56, P = 0.025$),碳源对 NDW3 菌株溶磷的影响达到极显著水平 ($F = 105.88, P = 0.01$),氮源和初始 pH 影响不显著。菌株 NDW1 和 NDW3 溶磷的最佳组合均为葡萄糖、蛋白胨及初始 pH 6,两菌株 24 h 内最高溶磷量分别为 294.95 和 312.93 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表1 菌株溶磷的正交试验结果¹⁾

Tab.1 Results of the orthogonal test of phosphate solubilizing by bacteria strains

序号	NDW1				序号	NDW3			
	碳源	氮源	pH	溶磷量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$		碳源	氮源	pH	溶磷量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$
1	1	1	1	281.60	1	1	1	278.12	
2	1	2	2	294.95	2	1	2	312.93	
3	1	3	3	207.35	3	1	3	245.02	
4	2	1	2	2.07	4	2	1	5.40	
5	2	2	3	4.55	5	2	2	4.55	
6	2	3	1	39.34	6	2	3	37.60	
7	3	1	3	7.76	7	3	1	6.94	
8	3	2	1	5.34	8	3	2	19.05	
9	3	3	2	32.50	9	3	3	30.50	
k1	261.30	97.14	108.76		k1	278.69	96.82	111.59	
k2	15.32	101.61	109.84		k2	15.85	112.18	116.28	
k3	15.20	93.06	73.22		k3	18.83	104.37	85.50	
R	246.10	8.55	36.62		R	262.84	15.36	30.77	
最优组合	1	2	2		最优组合	1	2	2	
主次顺序	碳源 > pH > 氮源				主次顺序	碳源 > pH > 氮源			

1)碳源1、2、3 分别表示葡萄糖、麦芽糖、蔗糖;氮源1、2、3 分别表示牛肉膏、蛋白胨、硝酸铵;pH 1、2、3 分别表示 pH 为 5、6、7。

2.3 溶磷菌产 IAA 的鉴定及对水稻的促生作用

2.3.1 溶磷菌产 IAA 能力 菌株 NDW1 和 NDW3 产 IAA 能力测定结果如表 2 所示:菌株 NDW1 和 NDW3 都有显色反应,不含色氨酸 King 培养液与加入 100 mg · L⁻¹ 色氨酸的 King 培养液相比较,后者比色液较前者颜色明显,说明含有色氨酸的 King 培养液能明显增加 2 株溶磷菌 IAA 的合成量;在培养 10 天后,NDW1 和 NDW3 在不含有色氨酸的 King 培养液中的 IAA 浓度分别为不含有色氨酸 King 培养液中 IAA 浓度的 2.21 和 2.80 倍。菌株 NDW3 的 IAA 分泌量较高于菌株 NDW1。

2.3.2 溶磷菌对苗期水稻的促生作用 为了进一步确定溶磷菌 NDW1 和 NDW3 在土壤中的溶磷能力及其对水稻的促生作用,利用沙培和土培的方法研究了菌株对苗期水稻的促生作用。从表 3 可以看出,添加溶磷菌 NDW3 后,2 种植植条件下对水稻株高和最大叶长有显著的促进作用,土培条件下根长、

地上干质量差异显著,沙培条件无明显的促进作用,地下干质量及叶绿素含量与 CK1 表现出显著差异。菌株 NDW1 在沙培与土培条件下尽管对水稻具有一定的促生能力,但与 CK 间差异不显著,其促生作用弱于 NDW3。

表 2 溶磷菌产 IAA 的测定

Tab. 2 Measurements of IAA production of two phosphorus solubilizing strains

King 培养液	菌株	$\rho_{\text{定量}}(\text{IAA})/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	定性
加色氨酸	NDW1	11.37 ± 0.36	粉色
	NDW3	15.62 ± 0.83	粉色
不加色氨酸	NDW1	5.41 ± 0.71	浅粉色
	NDW3	5.60 ± 0.24	浅粉色

2.4 溶磷菌对根际土壤速效磷含量及水稻植株全磷含量的影响

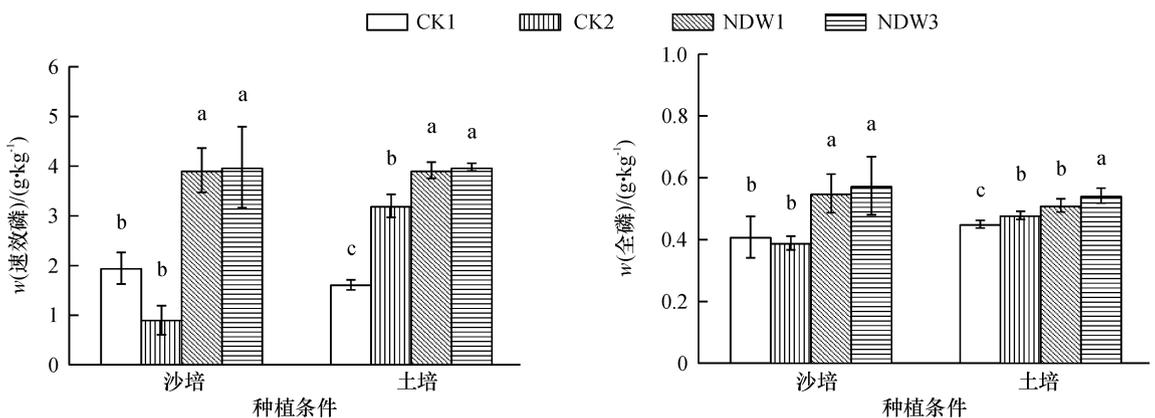
添加 2 种溶磷菌后对水稻根际土壤速效磷含量及苗期植株全磷含量的测定结果如图 5 所示。沙培

表 3 不同处理对水稻幼苗性状的影响¹⁾

Tab. 3 Effects of different treatments on traits of rice seedlings

种植条件	处理	株高/cm	根长/cm	最大叶长/cm	地上干质量/mg	地下干质量/mg	w(叶绿素)/($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
沙培	CK1	31.67 ± 4.58b	9.50 ± 0.10b	21.57 ± 0.72b	29.00 ± 7.21ab	8.33 ± 0.58b	81.64 ± 7.43b
	CK2	32.03 ± 0.80b	9.46 ± 0.23ab	19.27 ± 0.83c	27.67 ± 4.04b	8.67 ± 1.53ab	79.27 ± 0.17ab
	NDW1	34.20 ± 1.91ab	9.73 ± 0.11ab	20.93 ± 1.00b	30.67 ± 3.79ab	9.67 ± 1.15ab	88.90 ± 9.53ab
	NDW3	37.53 ± 1.00a	9.83 ± 0.25a	23.47 ± 0.58a	39.00 ± 5.57a	11.00 ± 2.00a	103.57 ± 9.37a
土培	CK1	31.20 ± 1.11b	9.73 ± 0.31b	19.73 ± 0.23c	44.67 ± 4.04b	17.67 ± 5.86b	37.82 ± 2.36b
	CK2	31.80 ± 0.87b	9.83 ± 0.25b	21.40 ± 1.60bc	47.67 ± 2.08b	18.33 ± 3.51ab	54.82 ± 0.39a
	NDW1	32.93 ± 0.42ab	10.03 ± 0.21ab	22.47 ± 0.31ab	49.33 ± 2.08b	26.67 ± 5.50ab	56.67 ± 0.18a
	NDW3	34.87 ± 1.70a	10.37 ± 0.20a	23.93 ± 1.92a	58.00 ± 5.29a	18.00 ± 3.00a	59.72 ± 2.81a

1) 沙培条件下,CK1:加全磷营养液,CK2:加 Ca₃(PO₄)₂ 和无磷营养液;土培条件下,CK1:不加 Ca₃(PO₄)₂,CK2:加 Ca₃(PO₄)₂; 2 种植植条件下,NDW1 和 NDW3 处理分别在 CK2 处理的基础上接种相应菌株。相同种植条件同列数据后相同小写字母表示不同处理间差异不显著(P > 0.05, Duncan's 法)。



沙培条件下,CK1:加全磷营养液,CK2:加 Ca₃(PO₄)₂ 和无磷营养液;土培条件下,CK1:不加 Ca₃(PO₄)₂,CK2:加 Ca₃(PO₄)₂; 2 种植植条件下,NDW1 和 NDW3 处理分别在 CK2 处理的基础上接种相应菌株。相同种植条件不同柱子上相同小写字母表示不同处理间差异不显著(P > 0.05, Duncan's 法)。

图 5 不同处理对水稻根际土壤速效磷含量及幼苗全磷含量的影响

Fig. 5 Effects of different treatments on soil available phosphorus contents and total phosphorus contents of rice seedlings

和土培条件下,添加溶磷菌可明显促进根际土壤速效磷含量的增加,处理与CK间差异显著。沙培条件下,添加溶磷菌可显著促进水稻植株全磷含量的增加。土培条件下,添加溶磷菌NDW3,可显著促进水稻植株全磷含量的增加;添加NDW1植株全磷含量增加效果不明显。

3 讨论与结论

溶磷微生物自1903年被发现和报道以来,这类微生物的研究及其在农业方面的应用越来越广泛。碳源对溶磷细菌的生存能力以及溶磷能力有不同的影响^[23],而土地利用方式可显著影响土壤有机碳与无机碳储量^[24]。本研究从吉林农业大学水稻试验田采集的水稻根际土壤中分离到2株溶磷能力较好的细菌菌株NDW1和NDW3,经16S rDNA鉴定,分别为肠杆菌 *Enterobacter* sp. 和沙雷氏菌 *Serratia* sp.。正交试验表明:菌株NDW1和NDW3在葡萄糖、蛋白胨及初始pH 6的NBRIP培养基中溶磷量能力最佳,24 h内容磷量可分别达到294.95和312.93 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,明显高于戴沈艳等^[25]报道的溶磷菌的溶磷量,略低于菌株C5-A对磷矿粉的溶磷量^[26]。

溶磷菌大多具有促进作物生长、提高作物产量、抗病的能力^[27]。将2株溶磷微生物施入冬小麦土壤中,植物磷含量、光合速率、穗粒数及产量增加,增产幅度分别为14.2%和8.7%^[28]。胡晓峰等^[29]报道菌株P1不仅对 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、磷矿粉和卵磷脂有较好的溶解效果,对一些土传病害病原菌也有抑制作用。多数研究者认为溶磷菌对植物的促生作用是由于其释放土壤中难溶性或不溶性磷,有效提高土壤供磷水平及磷肥利用率的原因,也有人认为有的溶磷微生物可分泌生长调节物质,促进根系生长^[30]。本研究发现溶磷菌NDW1和NDW3不仅具有分泌IAA的能力,在沙培和土培条件下对水稻都有一定的促生作用,尤其NDW3对水稻株高、根长、最大叶长及地上干质量的增加有相对明显的促进作用,且添加至土壤中有利于土壤速效磷含量及苗期水稻全磷含量的增加。郑文波等^[31]和谯天敏等^[32]的研究均表明同时接种不同的溶磷菌菌株均可促进植株生长,与对照相比植株株高、干质量和干鲜比均有较大幅度增加,叶绿素和植株全磷也有显著增加,这与本文的研究结果大体一致。沙培条件下,添加溶磷菌NDW1和NDW3均可明显促进水稻植株全磷含量的增加;而土培条件下只有溶磷菌NDW3对水稻植株全磷含量具有增加效应。这可能是因为沙培条件下

只有溶磷菌NDW1或NDW3一种菌落,环境条件对它们的溶磷能力影响较小。而土培时,土壤的理化性质及微生物群落对两菌株的影响不同,菌株NDW3受影响较小,溶磷能力仍表现出一定优势。

参考文献:

- [1] KHAN M S, ZAIDI A, AHMED M, et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi-current perspective[J]. Arch Agron Soil Sci, 2010, 56(1): 73-98.
- [2] 胡莹莹, 张民, 宋付朋. 控释复肥中磷素在马铃薯上的效应研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2003, 9(2): 174-177.
- [3] SHARMA S B, SAYYED R Z, TRIVEDI M H, et al. Phosphate solubilizing microbes: Sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. Springer Plus, 2013, 2(1): 587-601.
- [4] 谢亚萍, 李爱荣, 闫志利, 等. 不同供磷水平对胡麻磷素养分转运分配及其磷肥效率的影响[J]. 草业学报, 2014, 23(1): 158-166.
- [5] 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): 83-86.
- [6] HARIPRASED P, NIRANJANA S R. Isolation and characterization of phosphate solubilizing rhizobacteria to improve plant health of tomato[J]. Plant Soil, 2009, 316(1/2): 13-24.
- [7] 冯瑞章, 姚拓, 周万海, 等. 溶磷菌对燕麦生物量及植株氮、磷含量的影响[J]. 水土保持学报, 2009, 23(2): 188-192.
- [8] AHMAD F, AHMAD I, KHAN M S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities[J]. Microbiol Res, 2008, 163(2): 173-181.
- [9] 臧威, 孙剑秋, 王鹏, 等. 东北地区四种农作物根际磷细菌的分布[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(6): 1206-1210.
- [10] MADER P, KAISER F, ADHOLEY A, et al. Inoculation of root microorganisms for sustainable wheat rice and wheat black gram rotations in India[J]. Soil Biol Biochem, 2011, 43(3): 609-619.
- [11] 赵小蓉, 林启美. 小麦根际与非根际解磷细菌的分布[J]. 华北农学报, 2001, 16(1): 111-115.
- [12] 赵小蓉, 林启美. 玉米根际与非根际解磷细菌的分布[J]. 生态学杂志, 2001, 20(6): 62-64.
- [13] LIU Z, LI Y, ZHANG S, et al. Characterization of phosphate-solubilizing bacteria isolated from calcareous soils[J]. Appl Soil Ecol, 2015, 96: 217-224.

- [14] 刘江,谷洁,高华,等. 秦岭山区无机磷细菌筛选及其 Biolog 和分子生物学鉴定[J]. 干旱地区农业研究, 2012, 30(1): 184-189.
- [15] 陶涛,叶明,刘冬,等. 无机解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力研究[J]. 合肥工业大学学报, 2011, 34(2): 304-308.
- [16] 杨春武. 虎尾草和水稻抗碱机制研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2010.
- [17] AUSUBEL F, BRENT R, KINGSTON R E, et al. Short protocols in molecular biology[M]. 3 ed. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 1995.
- [18] BAKERMANS C, MADSEN E. Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters[J]. Microb Ecol, 2002, 44(2): 95-106.
- [19] MEHNAZ S, LAZAROVITS G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions[J]. Microb Ecol, 2006, 51(3): 326-335.
- [20] 冯月红,姚拓,龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展[J]. 草原与草坪, 2003(1): 3-7.
- [21] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 83-86.
- [22] 赵月华. 植株全磷测定方法[J]. 科技与管理, 2012, 39(2): 64.
- [23] KUNDU B S, GAUR A C. Inoculant carriers for phosphate-solubilizing micro-organisms[J]. Indian J Agr Sci, 1981, 51(4): 252-255.
- [24] 祖元刚,李冉,王文杰,等. 我国东北土壤有机碳、无机碳含量与土壤理化性质的相关性[J]. 生态学报, 2011, 31(18): 5207-5216.
- [25] 戴沈艳,贺云举,申卫收,等. 1株高效解磷细菌的紫外诱变选育及其在红壤稻田施用效果[J]. 环境学报, 2010, 19(7): 1646-1652.
- [26] 刘文干,何园球,张坤,等. 1株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 326-333.
- [27] HAMEEDA B, REDDY Y, HARISH K R. Effect of carbon substrates on rock phosphate solubilization by bacteria from composts and macrofauna [J]. Curr Microbiol, 2006, 53(4): 298-302.
- [28] 周毅,汪建飞,邢素芝,等. 解磷微生物有机肥对冬小麦产量形成的影响[J]. 麦类作物学报, 2013, 33(3): 526-529.
- [29] 胡晓峰,郭晋云,张楠,等. 1株溶磷抑病细菌的筛选及其溶磷特性[J]. 中国农业科学, 2010, 43(11): 2253-2260.
- [30] XIE H, PASTERNAK J J, GLICK B R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that over produce indoleacetic acid[J]. Curr Microbiol, 1996, 32(2): 67-71.
- [31] 郑文波,申飞,闫小梅,等. 红壤中产吲哚乙酸并具解磷作用的促生菌筛选鉴定及促生效果研究[J]. 土壤, 2015, 47(2): 361-368.
- [32] 譙天敏,李姝江,韩珊,等. 温哥华假单胞菌菌株 PAN4 解磷能力及对核桃的促生作用[J]. 华南农业大学学报, 2015, 36(5): 117-124.

【责任编辑 庄延】