

草木樨中华根瘤菌 CHW10B 溶磷特性及其对南方红豆杉的促生作用

李云玲^{1,2}, 侯沁文^{1,2}, 刘瑞祥^{1,2}, 任嘉红^{1,2*}, 张 易¹

(1. 长治学院生物科学与技术系, 山西 长治 046011; 2. 太行山生态与环境研究所, 山西 长治 046011)

摘要: [目的] 探讨南方红豆杉根际微生物草木樨中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) CHW10B 的溶磷特性及促生作用。 [方法] 利用液体发酵试验比较不同时间、碳源、氮源、碳氮比、培养温度等条件下 CHW10B 菌株的溶磷量, 采用温室盆栽法研究该菌株对南方红豆杉生长的影响, 并分析该菌株产嗜铁素、精氨酸脱羧酶、ACC 脱氨酶及有机酸等成分的能力。 [结果] 该菌株分别在培养时间 4 d、磷酸钙 $5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、初始 pH 值 7.0、装液量 1/2、NaCl 为 $0.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、温度 30°C 、碳源为葡萄糖、氮源为硫酸铵、碳氮比 100:1 时溶磷能力最强。将该菌株接种于 1 年生南方红豆杉实生苗 360 d 后, 苗木的地径、苗高、生物量比对照分别增长了 19.53%、20.14%、25.39%。该菌株能够产嗜铁素、精氨酸脱羧酶、ACC 脱氨酶 ($0.922 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) 和 IAA ($8.908 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 并可分泌大量有机酸—葡萄糖酸 ($5704.92 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)。 [结论] 草木樨中华根瘤菌 CHW10B 溶磷能力强, 对南方红豆杉促生作用显著, 适用于多种不同酸碱性土壤, 可高效应用于南方红豆杉的人工栽培, 具有被开发为生物肥料的潜力。

关键词: 草木樨中华根瘤菌; 南方红豆杉; 溶磷; 促生作用

中图分类号: S718.8

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2017)05-0751-08

Phosphate-solubilizing Characteristics and Growth-promoting Effect of *Sinorhizobium meliloti* CHW10B on *Taxus chinensis* var. *mairei*

LI Yun-ling^{1,2}, HOU Qin-wen^{1,2}, LIU Rui-xiang^{1,2}, REN Jia-hong^{1,2}, ZHANG Yi¹

(1. Department of Biological Science and Technology, Changzhi University, Changzhi 046011, Shanxi, China;

2. Ecological and Environmental Research Institute of Taihangshan Mountains, Changzhi 046011, Shanxi, China)

Abstract: [Objective] A phosphate-solubilizing bacterium, *Sinorhizobium meliloti* CHW10B, was selected from *Taxus chinensis* var. *mairei*. Its phosphate-solubilizing characteristics and growth-promoting effect on *T. chinensis* var. *mairei* were studied. [Method] The effects of culture time, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ concentration, carbon sources, nitrogen sources, initial pH, liquid filling volume, salt ions and other environment factors on phosphate solubilizing ability of strain CHW10B were studied by liquid fermentation experiment. Pot experiment was conducted to evaluate the role of strain CHW10B in promoting the growth of *T. chinensis* var. *mairei*. Some growth-promoting mechanism such as producing ACC deaminase, siderophore, indoleacetic acid, arginine decarboxylase and organic acid were determined. [Result] The results showed that CHW10B strain displayed the highest phosphate-dissolving capacity when the cultivation period was 4 days, the amount of calcium phosphate was $5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, the initial pH reached 7.0, the volume of liquid was 1/2, the NaCl concentration was $0.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the temperature was 30°C . The phosphate solubilizing capacity of the strain got the highest when using glucose as carbon source and ammonium sulfate

收稿日期: 2017-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(31100471); 山西省重点学科建设经费资助

作者简介: 李云玲(1976—), 女, 硕士, 讲师。主要研究方向: 环境微生物。电话: 13509755820。E-mail: lyl_0315@163.com

* 通讯作者: 任嘉红, 博士, 教授。主要研究方向: 森林微生物。E-mail: renjiahong@163.com

as nitrogen source. Moreover, the ratio of carbon to nitrogen (100:1) is optimum for strain CHW10B. After being inoculated with strain CHW10B, the ground diameter, seedling height and biomass of 1-year-old *T. chinensis* var. *mairei* seedlings increased by 19.53%, 20.14% and 25.39% in 360 days' post-inoculation, respectively. The strain could produce siderophore, arginine decarboxylase, ACC deaminase ($0.922 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$) and IAA ($8.908 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), and secrete a large amount of gluconic acid ($5704.92 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$). [Conclusion] *S. meliloti* CHW10B has strong phosphorus-solubilizing capability, and plays a significant promoting role in the growth of *T. chinensis* var. *mairei*. The strain can be applied to a variety of soils of different acidity-alkalinity. The result would be an important reference for further exploring of the CHW10B strain in production of bio-fertilizer and high efficient cultivation on *T. chinensis* var. *mairei*, etc.

Keywords: *Sinorhizobium meliloti*; *Taxus chinensis* var. *mairei*; phosphate-solubilization; growth-promoting effect

磷是植物生长必需的三大营养元素之一,我国土壤中总磷量较高,但多以无效形式存在,植物很难直接吸收利用^[1],而施入土壤的磷肥当季利用率一般只有10%~25%^[2],不能满足植物对磷的需求。大量研究证明,在土壤中存在许多溶磷微生物,它们不仅能将土壤中难溶性的磷酸盐活化,提高土壤中的有效磷含量^[3],还能在其代谢过程中分泌生长素(IAA)、ACC脱氨酶等,促进植物生长和减轻植物病害^[4-5]。应用溶磷微生物活化土壤难溶性磷被公认为是安全、经济和高效的生物措施^[6]。近些年,溶磷微生物已成为国内外研究的热点,但相关研究多集中于农作物,多年生林木较少^[7],且南方红豆杉根际溶磷细菌的系统研究更少^[8]。

南方红豆杉(*Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. var. *mairei* (Lemee et Levl.) Cheng et L. K. Fu)是我国一级保护野生濒危药用植物,采取人工栽培措施,在一定程度上能够克服南方红豆杉天然林生长缓慢、资源紧缺的问题^[9]。本课题组前期从南方红豆杉根际分离筛选到1株高效溶无机磷细菌——草木樨中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) CHW10B,经初步研究发现,该菌株对南方红豆杉60 d实生苗幼苗期生长有明显的促生作用^[8],并能稳定地定殖于南方红豆杉根际和根部^[10]。本研究在前期工作的基础上,进一步探讨该菌株产IAA、ACC脱氨酶、嗜铁素及精氨酸脱羧酶等促生长特性,分析比较其溶磷特性及对1年生南方红豆杉的促生效果,旨在完善该菌株的系统研究,为高效利用该菌株以更好提高南方红豆杉人工栽培效率、丰富生物肥料菌种资源奠定基础。

1 材料

1.1 供试菌株

高效溶磷草木樨中华根瘤菌 CHW10B,由本课题

组前期从南方红豆杉根际分离筛选得到。

1.2 供试植物

南方红豆杉1年生盆栽实生苗,栽培于长治市林业局苗圃。

1.3 供试培养基

溶磷能力测定培养基(NBRIP):葡萄糖 10 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, KCl 0.2 g, MgCl_2 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g, H_2O 1 000 mL, pH 值 7.0; 溶磷细菌活化和保藏培养基(LB): Tryptone 10 g, Yeast Extract 5 g, NaCl 10 g, H_2O 1 000 mL, pH 值 7.0~7.4, 溶磷细菌保藏培养基另加 15~20 g Agar 作为凝固剂; IAA 定量测定培养基(KB): Peptone 20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, 甘油 10 mL, H_2O 1 000 mL, pH 值 7.2; ACC 脱氨酶菌株生长培养基(ADF)见参考文献[11]。

2 研究方法

2.1 CHW10B 菌株溶磷动态

将 CHW10B 菌株于 LB 液体培养基中活化 2~3 次,制备种子液($1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)。向灭菌的 NBRIP 培养基中加入已灭菌磷酸钙,按 1% 接种量接入 CHW10B 种子液。以接入等量的 LB 培养基为空白对照。30℃、180 r·min⁻¹ 摇培 1 周。每天取发酵液离心 10 min (4℃, 10 000 r·min⁻¹), 取上清液,用钼锑抗比色法对可溶性磷含量进行测定^[12],并选择最适天数开展本研究中的后续实验。

2.2 磷酸钙浓度对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

向灭菌的 NBRIP 培养基中分别加入终浓度为 0.63、1.25、2.50、5.00、10.00 g·L⁻¹ 的磷酸钙,按 1% 接种量接入 CHW10B 种子液。各处理均设 3 个重复和 1 个空白对照,在 30℃、180 r·min⁻¹ 培养最适天数(4 d)后,取适量发酵液测定可溶性磷含量,

方法同 2.1。

2.3 碳源、氮源、碳氮比对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

将葡萄糖、果糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖和可溶性淀粉分别按 1% 比例加入到 NBRIP 液体培养基中作为唯一碳源;将 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 KNO_3 、牛肉膏、酵母膏、蛋白胨分别按 0.1% 的比例加入 NBRIP 液体培养基中作为唯一氮源;以最适的碳源和氮源,将 NBRIP 培养基的 C/N 调到 150/1、125/1、100/1、75/1、50/1 和 25/1。每处理设 3 个重复和 1 个空白对照,按 1% 接种量进行接种,在 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养最适天数(4 d)后,测定可溶性磷含量,方法同 2.1。

2.4 温度、pH 值、装液量、NaCl 浓度对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

按 1% 的接种量将 CHW10B 种子液接入到 NBRIP 液体培养基中,设置培养温度分别为 20、25、30、35、 40°C ;将 NBRIP 液体培养基 pH 值分别调至 4、5、6、7、8、9、10;分别将 20、40、50、60、80 mL NBRIP 培养基加入到 100 mL 三角瓶中,使其体积比分别为 1/5、2/5、1/2、3/5、4/5;调节 NBRIP 培养基的 NaCl 浓度为 0.0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。各处理设 3 个重复和 1 个空白对照, 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养最适天数(4 d)后,测定可溶性磷含量,方法同 2.1。

2.5 CHW10B 菌株产有机酸、ACC 脱氢酶、IAA、ADC、嗜铁素能力测定

用高效液相色谱(HPLC)法测定有机酸。取培养 72 h 的 CHW10B 发酵液(NBRIP 液体培养基)并进行离心(4°C 、 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 2 次,每次 20 min),取上清液 5 mL 过 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜,用高效液相色谱仪(Agilent 1100 series, 美国产)测定有机酸的种类和含量。色谱条件为:色谱柱为菲罗门 C18 柱,缓冲液为 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾(pH 值 2~3),柱温 30°C ,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 214 nm。同时,设置未接种空白对照,测定方法同 CHW10B 发酵液。

参考 Saleh 等^[11,13]的研究方法进行 CHW10B 菌株 ACC 脱氢酶活性测定,IAA 含量测定采用 Salkowski 比色法^[14],产精氨酸脱羧酶(ADC)能力测定参照 Sun 等^[15]的方法,产嗜铁素参照 Yu 等^[16]的方法采用 CAS 平板进行定性检测。

2.6 CHW10B 菌株对 1 年生南方红豆杉的促生作用

活化 CHW10B 菌株, 30°C 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 2

d,取培养液离心 $5 \sim 6 \text{ min}$ (4°C 、 $5\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$),无菌生理盐水润洗菌体 3 次后,用无菌生理盐水制成 $8 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 接种剂。灌根接种于南方红豆杉实生苗(苗龄 1 a),每株 25 mL,对照为等量的无菌生理盐水。每处理设 15 个重复,置于温室中培养,360 d 后测定南方红豆杉的生物量、地径和苗高。

3 结果与分析

3.1 CHW10B 菌株溶磷量动态变化

从图 1 可看出:前 4 d CHW10B 菌株培养液的可溶磷含量逐渐增加,到第 4 天时达到峰值($757.752 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),此时溶磷能力最强;4 d 后该菌的溶磷能力明显降低,但到第 7 天却有所回升,回升原因可能是培养后期营养耗尽,菌体细胞大量死亡裂解导致可溶性磷释放。以上结果说明,该菌株溶磷的最佳培养时间为 4 d。

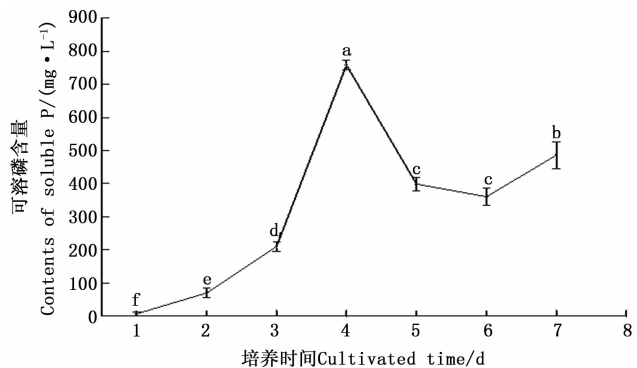


图 1 CHW10B 菌株在 30°C 下摇床培养 7 d 时培养液可溶磷含量的变化

Fig. 1 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated 7 days under 30°C

3.2 磷酸钙浓度对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

图 2 表明:随着磷酸钙浓度的增加,CHW10B 菌株的溶磷量呈先上升后下降的趋势;在磷酸钙浓度为 $2.50 \sim 10.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该菌株皆表现出较强的溶磷活性;磷酸钙为 $5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该菌株的溶磷量最高($740.310 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),溶磷能力最强。

3.3 碳源、氮源、碳氮比对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

3.3.1 碳源对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响 图 3 表明:不同碳源明显影响 CHW10B 菌株溶解磷酸钙的能力;以葡萄糖为唯一碳源时,该菌株溶磷能力最强,溶磷量达 $740.310 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;其次为果糖($79.457 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$);以麦芽糖、甘露醇、蔗糖和可溶性淀粉为碳源时,溶磷量大幅降低,尤其以可溶性淀

粉为碳源时,溶磷量最小($2.907 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。由此可知,葡萄糖为 CHW10B 菌株充分发挥其溶磷功能的最适碳源。因此,在 CHW10B 菌株的实践中,应考虑与可以降解土壤中多糖的菌株结合使用。

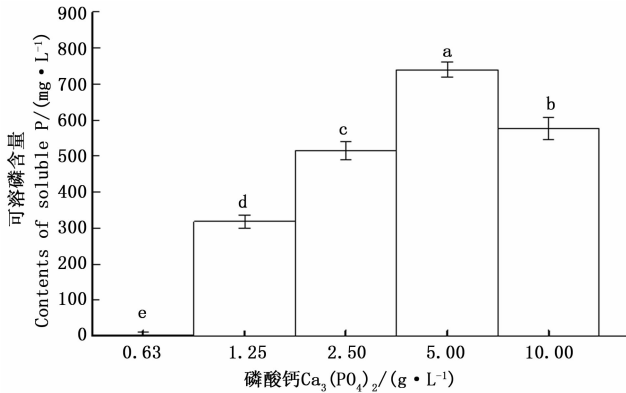


图2 不同磷酸钙浓度下 CHW10B 菌株培养液可溶磷含量的变化

Fig. 2 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different calcium phosphate contents

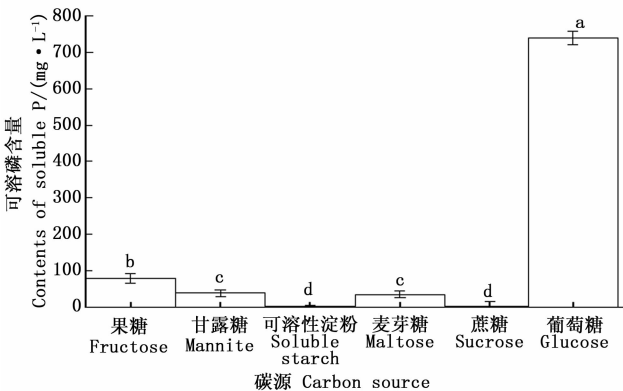


图3 不同碳源下 CHW10B 菌株培养液可溶磷含量的变化

Fig. 3 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different carbon sources

3.3.2 氮源对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响 图4表明:不同氮源条件下,CHW10B 菌株溶磷能力差异显著;以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时,CHW10B 菌株的溶磷能力最强,溶磷量为 $738.372 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;以 NH_4NO_3 为氮源时,该菌株的溶磷能力比以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时略低(溶磷量为 $720.504 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),但二者差异不显著。以牛肉膏、酵母膏和蛋白胨为氮源时,该菌株的溶磷能力明显下降,而以 KNO_3 为氮源时,该菌株的溶磷能力最弱(溶磷量为 $179.201 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。说明该菌株以 NH_4^+ 为氮源时的溶磷能力明显比以 NO_3^- 为氮源时的强, NH_4^+ 适合该菌株溶磷能力的充分发挥。因此,CHW10B 菌

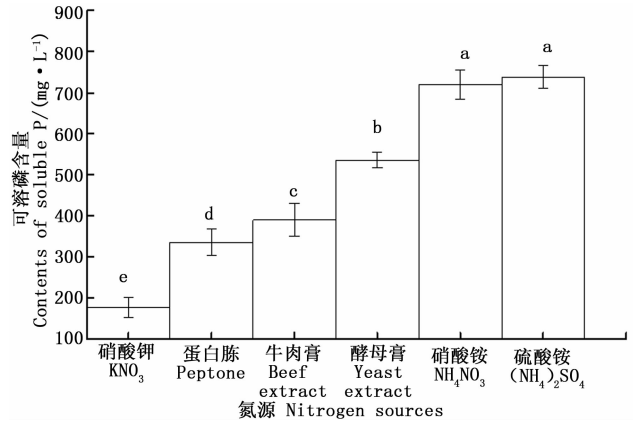


图4 不同氮源下 CHW10B 菌株培养液可溶磷含量的变化

Fig. 4 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different nitrogen sources

株溶磷作用最适氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$,在实践应用中与 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 没有显著差异的 NH_4NO_3 也可以考虑。

3.3.3 碳氮比对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

以最适碳源(葡萄糖)和最适氮源(硫酸铵)分别作为碳源和氮源,比较不同 C/N 对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响。图5表明:不同 C/N 对 CHW10B 菌株的溶磷能力影响显著;C/N $\leq 100/1$ 时,C/N 越大,CHW10B 菌株的溶磷能力越强;C/N $> 100/1$,随着 C/N 升高,该菌株的溶磷能力反而减弱。C/N 为 25/1 时,该菌株的溶磷量最低($318.542 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),C/N 为 100/1 时,该菌株的溶磷量最高($684.108 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),此时溶磷能力最强。

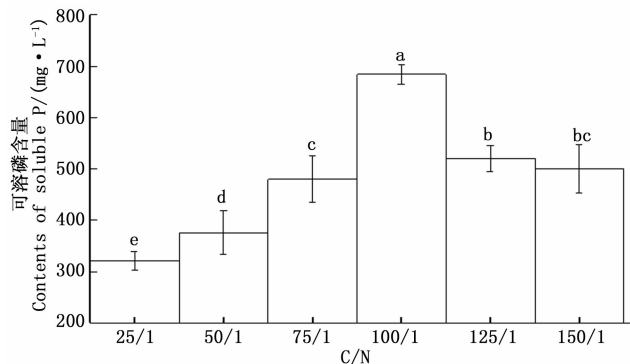


图5 不同 C/N 下 CHW10B 菌株培养液可溶磷含量的变化

Fig. 5 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different C/N

3.4 环境条件对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

3.4.1 初始 pH 值对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

图6表明:随着 pH 值的升高,CHW10B 菌株的溶磷能力表现为先增长后降低;当初始 pH 值为 10

时,该菌株的溶磷能力最差,但可溶性磷含量仍达 $521.318 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;初始 pH 值为 7 时,该菌株的溶磷能力最强 ($727.713 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。以上结果表明,CHW10B 菌株对不同的 pH 值具有较强的适应能力,但中性条件最利于其溶磷功能的发挥,这也暗示了该菌株可以应用于多种不同酸碱性土壤中。

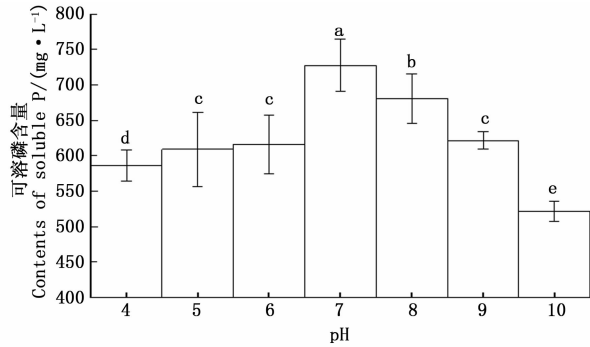


图6 不同初始 pH 值下 CHW10B 菌株培养液可溶性磷含量的变化

Fig. 6 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different initial pH

3.4.2 装液量对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

溶氧量对微生物的生长有重要作用,不同微生物对溶解氧需求也不同。装液量是影响溶氧量的一个重要因素,装液量越少,溶氧系数越大,溶氧量越多。图 7 表明:CHW10B 菌株在不同装液量下均有一定的溶磷能力,但溶磷能力的强弱不同:装液量 $400 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (2/5) 和 $800 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (4/5) 时,CHW10B 菌株的溶磷能力差异不显著;装液量 $600 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (3/5) 时,CHW10B 菌株的溶磷能力最差;装液量 $500 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (1/2) 时,CHW10B 菌株的溶磷能力最强,溶磷量高达 $750.001 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由此可知,装液量 $500 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ (1/2) 为本研究条件下 CHW10B 菌株溶磷的最适装液量。

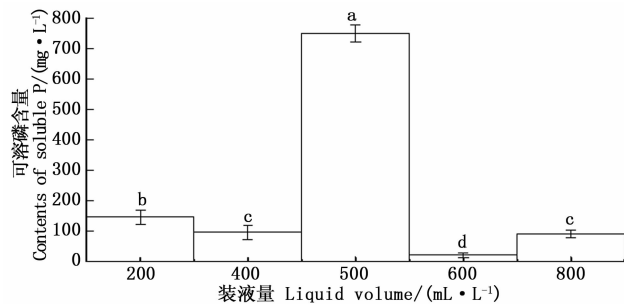


图7 不同装液量下 CHW10B 菌株培养液可溶性磷含量的变化

Fig. 7 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different liquid volume in flask

3.4.3 NaCl 浓度对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

图 8 表明:CHW10B 菌株在 NaCl 浓度为 $0.0 \sim$

$20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 内均能生长,但溶磷能力不同,且差异显著 ($P < 0.05$),NaCl 浓度越高,其溶磷量反而越低。当 NaCl 浓度为 $0.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,CHW10B 菌株的溶磷能力最强,发酵液中可溶性磷含量为 $736.434 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;NaCl 为 $20.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,该菌株几乎不表现溶磷功能。可能由于高浓度 Na^+ 造成的高渗溶液中微生物体细胞活动受抑制甚至死亡,进而影响到该菌株的溶磷能力。

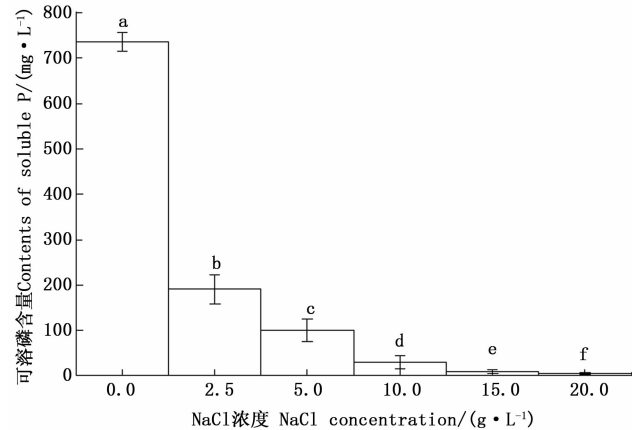


图8 不同 NaCl 浓度下 CHW10B 菌株培养液可溶性磷含量的变化

Fig. 8 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different concentration of NaCl

3.4.4 温度对 CHW10B 菌株溶磷能力的影响

图 9 表明:CHW10B 菌株培养液在 $20 \sim 40^\circ\text{C}$ 下均有一定的溶磷能力,但差异显著 ($P < 0.05$)。该菌株培养液的溶磷能力由大至小的温度为: 30°C 、 35°C 、 25°C 、 40°C 、 20°C ,其最高溶磷量为 $749.576 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最低溶磷量为 $287.462 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。温度低于 30°C 时,随着温度的升高,CHW10B 菌株的溶磷量增加;当温度超过 30°C 后,其溶磷量随着温度的增加反而降低。可能是因为 30°C 时 CHW10B 菌株的生长发育和新陈代谢皆处于较好状态,相关的酶活性较强,而温度的升高或降低,都会影响到该菌株的生长繁殖和新陈代谢,使其溶磷能力降低。因此,该菌株溶磷最适温度为 30°C 。

3.5 CHW10B 菌株产有机酸能力

表 1 表明:CHW10B 菌株发酵液产生有机酸,且有机酸总量为 $5710.82 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,比对照组的 $665.05 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 高 758.70% 。CHW10B 菌株分泌的有机酸为草酸和葡萄糖酸,与对照相比,虽然少了甲酸和柠檬酸,但其葡萄糖酸的产生量远大于对照,分泌草酸的量与 CK 的相差不大。葡萄糖酸一方面能降低 pH 值从而溶解难溶性磷,另一方面还能与

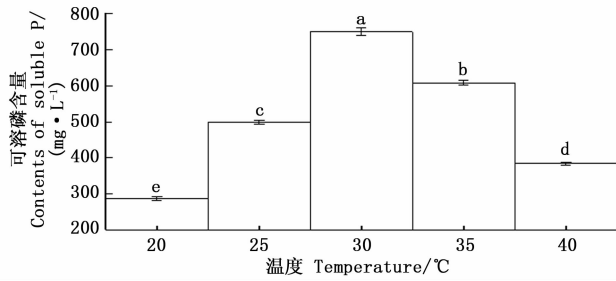


图9 不同温度下 CHW10B 菌株培养液可溶磷含量的变化

Fig.9 Changes of soluble phosphate content in culture liquid of strain CHW10B cultivated under different temperature

Al^{3+} 等螯合释放磷酸根^[17]。由此可见,CHW10B 菌株发酵液良好的分泌葡萄糖酸的能力促进了其高效溶磷作用。

表1 CHW10B 菌株分泌的有机酸种类和含量

Table 1 The kinds and concentrations of organic acid strain CHW10B secreted

有机酸 Organic acids	有机酸含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ The content of organic acids	
	CHW10B	CK
草酸 Oxalic acid	5.90	5.94
葡萄糖酸 Glucose acid	5 704.92	641.53
甲酸 Formic acid	-	15.19
柠檬酸 Citric acid	-	2.38
有机酸总量 Organic acids amount	5 710.82	665.04

注:“-”代表未检测到。Note:“-” represents not detected.

3.6 CHW10B 菌株产 ACC 脱氨酶、IAA、嗜铁素及精氨酸脱羧酶能力

经测定,CHW10B 菌株可以产生吲哚乙酸 (IAA) 和 ACC 脱氨酶,产 IAA 量为 $8.908 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,其 ACC 脱氨酶比活力为 $0.922 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。采用 CAS 平板对 CHW10B 菌株进行产铁载体定性测定,结果表明:CHW10B 菌株能产生铁载体(图 10)。图 11 表明:该菌株还具有产精氨酸脱羧酶的能力。以上结果说明,CHW10B 菌株具有多种植物促生特性。

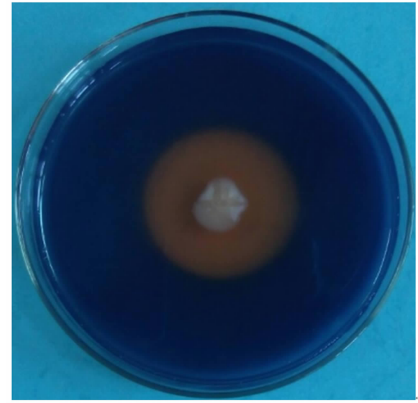


图10 CHW10B 菌株的 CAS 平板检测

Fig.10 Siderophore production of strain CHW10B on CAS agar plates



图11 CHW10B 菌株产精氨酸脱羧酶定性测定结果

Fig.11 Qualitative determination results of strain CHW10B on producing Arginine decarboxylase

3.7 CHW10B 菌株对南方红豆杉的促生作用

南方红豆杉 1 年生实生苗接种 CHW10B 菌株后 360 d 的生长情况(表 2)表明:接种 CHW10B 菌剂对南方红豆杉生长具促进作用,与对照相比,南方红豆杉实生苗地径、苗高和生物量的增长率分别为 19.53%、20.14% 和 25.39%。CHW10B 菌株对南方红豆杉实生苗生物量和苗高的促生作用达极显著($P < 0.01$),而对地径的促生作用达显著($P < 0.05$)。

表2 CHW10B 菌株对南方红豆杉生长的影响

Table 2 The effect of strain CHW10B on the growth of *Taxus chinensis* var. *mairiei*

项目 Item	南方红豆杉 <i>Taxus chinensis</i> var. <i>mairiei</i>						增长率 Growth rate/%
	CK			CHW10B			
	平均值 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$	最大值 Max	最小值 Min	平均值 \pm 标准差 $\bar{x} \pm s$	最大值 Max	最小值 Min	
生物量 Biomass/ $(\text{mg} \cdot \text{株}^{-1})$	11.54 ± 1.87 a	15.65	9.60	14.47 ± 2.04 b	18.13	11.41	25.39
苗高 Seedling height/cm	31.09 ± 2.06 a	33.21	26.62	37.35 ± 2.75 b	39.35	29.39	20.14
地径 Ground diameter/mm	5.58 ± 0.99 a	7.62	3.53	6.67 ± 1.16 b	9.25	5.09	19.53

注:同行不同小写字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note:The different small letters in the samerow mean the significant difference at $P < 0.05$.

4 讨论

不同溶磷微生物的溶磷能力有差异,如王舒等^[3,7]从油茶根际分离到的耳假单胞菌 WB38 等 5 株溶磷细菌发酵液中有效磷含量为 $401.56 \sim 475.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,而阿氏芽孢杆菌 NC285 则高达 $794.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;王俊娟等^[18]从油松根际分离到的泛菌属溶磷菌 D2 发酵液有效磷含量最高为 $392.13 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;张希涛等^[1]从厚荚相思树根际分离的相思根瘤菌 G7-3 无机磷发酵液有效磷含量为 $4.142 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本研究中,从南方红豆杉根际分离得到的草木樨中华根瘤菌 CHW10B,其基本培养基发酵液中可溶磷量最高可达 $757.752 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上菌株皆为溶无机磷细菌,草木樨中华根瘤菌 CHW10B 溶磷能力虽比阿氏芽孢杆菌 NC285 稍弱,但比其他菌株强很多,为高效溶磷菌。

溶磷微生物的溶磷作用并非一成不变,随着外界环境或营养物质的变化,其溶磷效果也发生改变^[19]。许多研究表明,碳是影响溶磷菌生长繁殖和生理生化代谢包括溶磷作用等的最主要因素,不同溶磷菌株的最佳碳源及利用碳源的广泛性存在明显区别,如节杆菌 1TCRi7 只有以葡萄糖为碳源时才具有溶磷能力^[20];而洋葱伯克霍尔德氏菌 C5-A^[17]、耳假单胞菌 WB38^[7]、泛菌属溶磷菌 D2^[18]、荧光假单胞菌 JW-JS1^[21] 和本研究中的草木樨中华根瘤菌 CHW10B 溶磷碳源较广,以葡萄糖、麦芽糖、蔗糖等分别作为碳源时皆具有溶磷能力;在后 4 株菌中,除洋葱伯克霍尔德氏菌 C5-A 以麦芽糖为碳源时溶磷作用最强外,其余均以葡萄糖为碳源时溶磷能力最强。草木樨中华根瘤菌 CHW10B 溶磷最佳碳源为葡萄糖也可能与其溶磷过程中产生大量的葡萄糖酸有关^[19,22]。

不同溶磷微生物对不同氮源利用效率也不尽相同。本研究中,草木樨中华根瘤菌 CHW10B 以 NH_4^+ 为氮源时的溶磷能力明显比以 NO_3^- 为氮源时的强,以硫酸铵为氮源时溶磷能力最强,以硝酸铵为氮源时溶磷能力次之,而以硝酸钾为氮源时的溶磷能力明显降低,这与耳假单胞菌 WB38^[7] 溶磷氮源情况相似,不同的是后者以硝酸铵为氮源时溶磷能力最强,硫酸铵次之。本研究结果与赵小蓉等^[20] 和范丙全等^[23] 发现的溶磷菌通常以 NO_3^- 为氮源时的溶磷量高于以 NH_4^+ 为氮源时的溶磷量相反。另外,范丙全等^[23] 认为,使用铵态氮时主要分泌苹果

酸、柠檬酸、乙酸、琥珀酸、丙酸,而硝态氮条件下几乎不产生这些有机酸。本研究中,CHW10B 菌株以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源时产生大量的葡萄糖酸,并没有产生其他有机酸,其具体原因有待进一步研究。

有研究表明,适当调整 C/N 值,溶磷微生物可能会释放更多磷^[21],不同菌株对培养基中 C/N 值反应差异显著。本研究发现,当 $\text{C/N} < 100/1$ 时,随培养基的 C/N 值升高,草木樨中华根瘤菌 CHW10B 的溶磷能力逐渐增强;当 $\text{C/N} = 100/1$ 时,草木樨中华根瘤菌 CHW10B 菌株溶磷能力最强,这与刘辉等^[21] 关于荧光假单胞菌 JW-JS1 菌株和赵小蓉等^[20] 关于欧文氏杆菌的研究结果相同;当 $\text{C/N} > 100/1$ 时,CHW10B 菌株的溶磷能力逐渐减弱,与青霉和肠杆菌的结果^[20] 不一致,可能是因为不同菌株自身所适宜的 C/N 有所不同。

本研究中的草木樨中华根瘤菌 CHW10B 是分离自南方红豆杉根际的高效溶磷菌株,具有在南方红豆杉根际发展成优势种群的前提,该菌株除产生葡萄糖酸具有较强溶磷能力外,还可产 ACC 脱氨酶、IAA、铁载体和精氨酸脱羧酶,具有多种植物促生特性。将该菌株制成菌剂作用于 1 年生南方红豆杉实生苗后,具有良好的促生效应。在本课题组的前期研究中,CHW10B 对 60 d 南方红豆杉幼苗生长也表现出明显的促生作用。可以看出,该菌株有望被制成生物肥料,应用于南方红豆杉等的人工栽培,具有较高的应用潜力。若将该菌株更好应用于农林业生产中,还需进一步结合实践中土壤和周围环境的实际情况,进行深入验证。

5 结论

碳源、氮源、碳氮比和温度等环境条件均对 CHW10B 菌株的溶磷能力有一定的影响,以葡萄糖为碳源,硫酸铵为氮源,且碳氮比为 100/1 时,该菌株的溶磷能力最强。该菌株溶磷能力最强的其他环境条件分别为培养时间 4 d、磷酸钙 $5.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、初始 pH 值 7.0、装液量 1/2、NaCl 为 $0.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、温度 30°C 。将该菌株接种于 1 年生南方红豆杉根部 360 d 后,发现其对南方红豆杉有明显的促生作用。经检测,该菌株除产生大量葡萄糖酸外,还产生可促进植物生长的 IAA、ACC 脱氨酶、嗜铁素和精氨酸脱羧酶。鉴于该菌株对南方红豆杉良好的促生作用,结合其溶磷特性,可将该菌株应用于南方红豆杉的种植。

参考文献:

- [1] 张希涛, 康丽华, 马海宾, 等. 具有解磷能力的相思根瘤菌的筛选[J]. 林业科学研究, 2008, 21(5): 619-624.
- [2] 张玉兰, 王俊宇, 马星竹, 等. 提高磷肥有效性的活化技术研究进展[J]. 土壤通报, 2009, 40(1): 194-202.
- [3] 王舒, 张林平, 郝菲菲, 等. 油茶根际高效溶磷细菌的筛选、鉴定及其安全性测试[J]. 林业科学研究, 2015, 28(2): 166-172.
- [4] Babita K J, Monhandass G P, et al. Simultaneous phosphate solubilization potential land antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*[J]. World J Microbiol Biotechnol, 2009, 25: 573-581.
- [5] 梅新兰, 闪安琪, 蒋益, 等. 适应玉米的溶磷细菌筛选及其对玉米生长的影响[J]. 土壤学报, 2016, 53(2): 502-509.
- [6] 史发超, 殷中伟, 江红梅, 等. 一株溶磷真菌筛选鉴定及其溶磷促生效果[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1333-1343.
- [7] 王舒, 张林平, 张扬, 等. 红壤区油茶根际解磷细菌的筛选、鉴定及其解磷能力[J]. 林业科学研究, 2015, 28(3): 409-416.
- [8] 任嘉红, 刘辉, 吴晓蕙, 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, 52(3): 295-303.
- [9] 肖遥, 楚秀丽, 徐肇友, 等. 南方红豆杉2年生容器苗多点试验的生长节律家系变异[J]. 林业科学研究, 2016, 29(2): 238-244.
- [10] 任嘉红, 刘辉, 姜楠, 等. GFP标记溶磷草木樨中华根瘤菌 CHW10B 及其定殖[J]. 林业科学, 2015, 51(1): 74-79.
- [11] Penrose D M, Glick. Methods for Isolating and Characterizing ACC Deaminase-Containing Plant Growth-Promoting Rhizobacteria[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15.
- [12] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法(第一版)[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [13] Saleh S S, Glick B R. Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(8): 698-705.
- [14] Johan H, Leveaul J, Lindow S E. Utilization of the plant hormone indole-3-Acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290 [J]. Applied Environment Microbiology, 2005, 71(5): 2365-2371.
- [15] Sun L N, Zhang Y F, He L Y, et al. Genetic diversity and characterization of heavy metal-resistant-endophytic bacteria from two copper-tolerant plant species on copper mine wasteland [J]. Biore-source Technology, 2010, 101(2): 501-509.
- [16] Yu X, Chen M, Jiang Z, et al. The two-component regulators GacS and GacA positively regulate a nonfluorescent siderophore through the Gac/Rsm signaling cascade in high-siderophore-yielding *Pseudomonas* sp. strain HYS [J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(18): 3259-3270.
- [17] 刘文干, 何园球, 张坤, 等. 一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.
- [18] 王俊娟, 阎爱华, 王薇, 等. 铁尾矿区油松根际溶磷泛菌 D2 的筛选鉴定及溶磷特性[J]. 应用生态学报, 2016, 27(11): 3705-3711.
- [19] Yi Y M, Huang W Y, Ge Y. Exopolysaccharide: a novel important factor in the microbial dissolution of tric alcium phosphate [J]. World J. Microbiol. Biotechnol, 2008, 24: 1059-1065.
- [20] 赵小蓉, 林启美, 李保国. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(2): 197-204.
- [21] 刘辉, 吴小芹, 任嘉红, 等. 一株荧光假单胞菌的溶磷特性及其对杨树的促生效果[J]. 林业科学, 2013, 49(9): 112-118.
- [22] Patel D K, Archana G, Kumar G N. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars [J]. Current Microbiology, 2008, 56(2): 168-174.
- [23] 范丙全, 金继运, 葛诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(5): 525-530.

(责任编辑:徐玉秀)