

# 一株溶植酸磷类芽孢杆菌的分离筛选及对水稻幼苗的促生作用

渠露露 彭长连 李淑彬\*

(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

**摘要** 采用溶磷平板筛选和重金属耐性复筛相结合,从薇甘菊根际分离到一株兼具多重金属抗性的溶磷细菌(编号为ZLT11),16S rRNA基因序列分析显示,该菌株属于类芽孢杆菌。菌株对植酸钙和植酸的溶磷量分别为84.10和73.84 mg·L<sup>-1</sup>,其在30℃、初始pH为9.0时对植酸钙的溶磷量最高,达95.66 mg·L<sup>-1</sup>。菌株ZLT11能耐受≤400 mg·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup>、≤100 mg·L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>及≤40 mg·L<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup>,当添加植酸钙为磷源时,接种菌株ZLT11使水稻幼苗平均根长、根数、苗高和总生物量较对照幼苗分别增加106.7%、76.6%、49.0%和46.3%。菌株ZLT11还能显著促进水稻幼苗在Cd胁迫下的生长。

**关键词** 植酸磷;类芽孢杆菌;重金属耐受;水稻

**Isolation and screening of a phytate phosphate-solubilizing *Paenibacillus* sp. and its growth-promoting effect on rice seeding.** QU Lu-lu, PENG Chang-lian, LI Shu-bin\* (College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China).

**Abstract:** The phosphate-solubilizing medium plate screening and heavy metal resistance rescreening were used to isolate a phosphate-solubilizing bacterium (coded ZLT11) from the rhizosphere of *Mikania micrantha*. Results from 16S rRNA gene sequence analysis revealed that the strain ZLT11 belonged to *Paenibacillus* sp. The amount of phosphorus solubilized from calcium phytate and phytic acid by the ZLT11 was 84.10 and 73.84 mg·L<sup>-1</sup>, respectively. The maximum phosphate solubilizing activity to calcium phytate (95.66 mg·L<sup>-1</sup>) was at 30℃ and initial pH 9.0. The strain ZLT11 displayed the tolerance to ≤400 mg·L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup>, ≤100 mg·L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup>, and ≤40 mg·L<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup>. With calcium phytate as phosphorus source, the inoculation strain ZLT11 treatment increased the average root length, root number, seedling height and total biomass of rice seedlings by 106.7%, 76.6%, 49.0% and 46.3%, respectively. The strain ZLT11 could improve rice seedlings growth under Cd stress.

**Key words:** phytate phosphate; *Paenibacillus* sp.; heavy metal-tolerance; rice.

磷是植物需从土壤中获取的三大必需营养因子之一<sup>[1]</sup>。虽然土壤总磷含量较高,但植物可以直接吸收利用的有效磷远低于植物生长需求量<sup>[2]</sup>。通过施加可溶性磷肥可解决土壤有效磷限制问题,然而植物对施入土壤的磷肥当季利用率很低,这不仅会加剧土壤磷的固定过程进而造成土壤板结,还会引起土壤磷流失、水体磷污染及富营养化等环境问题<sup>[3]</sup>。

本文由国家重点研发项目(2017YFC1200105)和国家自然科学基金项目(31870374)资助 This work was supported by the National Key R&D Program of China (2017YFC1200105) and the National Natural Science Foundation of China (31870374).

2019-09-18 Received, 2019-11-12 Accepted.

\*通讯作者 Corresponding author. E-mail: shuli\_1990@126.com

一些微生物能够将植物难以吸收利用的无效磷转化为可吸收利用磷,称为解磷菌或溶磷菌(phosphate-solubilizing microorganism)<sup>[4]</sup>。应用溶磷细菌增加土壤有效磷含量、促进农作物生长已在多个研究中得到证实。如用有机磷降解细菌菌株y9-4处理可使小油菜产量提高95%<sup>[5]</sup>。用溶磷细菌肠杆菌(*Enterobacter* spp.)菌株san5、DK6、san8及泛菌(*Pantoea* sp.)菌株san6等单独和混合接种均可显著提高大豆生物量、根瘤数、植株全磷及土壤速效磷含量<sup>[6]</sup>。溶磷菌已被公认为安全、经济、高效的土壤磷活化剂,然而目前仍存在溶磷菌株溶磷活性容易丧失、易受环境影响而效果不稳定等不足<sup>[2,6]</sup>,有

必要筛选更多的溶磷菌株资源。

近年来,土壤重金属污染日趋严重,给农业生产和食品安全带来严峻考验<sup>[7-8]</sup>。研究发现,对重金属具有较高耐受性的植物根际促生菌不仅能够促进植物在重金属污染土壤中的生长,也能调控植物对重金属的吸收和转运<sup>[7,9]</sup>。筛选兼具重金属耐受及溶磷能力的菌株并将之运用于农业生产,对于提高重金属污染土壤农业生产效率、维持土壤磷素平衡、降低施肥过量所造成的环境污染意义重大。

目前对溶磷细菌的研究大多集中在作物根际土壤与内生细菌,对入侵植物根际土壤溶磷菌的研究报道较少。本研究从恶性入侵植物薇甘菊(*Mikania micrantha*)根际土壤采样,分离筛选出一株兼具多重金属耐受及溶磷能力的细菌菌株,并以水稻为材料探究其促生效应,以期丰富溶磷菌株资源,为重金属污染土壤中促生菌剂筛选和研制提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、DNA 胶回收纯化试剂盒购自上海生物工程有限公司;植酸钙、磷酸钙等化学试剂购于青岛海博生物技术有限公司;Longgene LK200 型 PCR 仪,杭州朗基科学仪器有限公司;UV-2550 型紫外-可见分光光度计,日本岛津股份有限公司;PB-10 酸度计,德国 Sartorius 公司。

### 1.2 主要培养基

1) 溶磷培养基参照 Pikovskaya<sup>[10]</sup> 配制含不同磷化合物的蒙金娜培养基;2) 参照杜连祥等<sup>[11]</sup> 配制牛肉膏蛋白胨培养基;3) 参照王玉英<sup>[12]</sup> 配制无磷 MS 培养液。

### 1.3 溶磷细菌的分离筛选及重金属耐受测定

采用五点采样法收集薇甘菊(生长地点为广州市钟落潭镇,23°24' N, 113°25' E) 根际土壤。按照无菌操作取土样于带有玻璃珠的无菌水中震荡打散并用无菌水系列稀释到  $10^{-5}$  后,吸取 100  $\mu\text{L}$  稀释土壤悬液均匀涂布到蒙金娜植酸钙培养基平板上,30  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养,定时观察菌苔生长和溶磷圈产生情况。挑取溶磷圈较大的菌落划线纯化后,用灭菌超纯水制成吸光度  $\text{OD}_{600} \approx 0.5$  的菌悬液,取 3  $\mu\text{L}$  菌悬液滴加到蒙金娜植酸钙培养基平板中央,30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d 后测量溶磷圈直径与菌落直径,计算其比值。将溶磷圈直径/菌落直径比值  $\geq 1.5$  的菌株转接牛肉膏蛋白胨斜面,4  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

按照卞光凯等<sup>[13]</sup> 的方法分别配制 50、100、200、300 和 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Cd}^{2+}$  溶液,100、200、400、600 和 1000  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Pb}^{2+}$  溶液及 10、20、30、40 和 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\text{Hg}^{2+}$  溶液。采用平板-纸片法初步测定各溶磷菌株对上述重金属的耐受能力;将灭菌的圆滤纸片(直径为 6 mm)轻贴于预先均匀涂布菌液的牛肉膏蛋白胨平板表面,再于各滤纸片上分别滴加 8  $\mu\text{L}$  不同浓度的重金属溶液,30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 2 d 后观察结果。纸片周围无透明圈出现即为耐受。每一菌株每次测定 4 个重复;以重金属 Cd 为例,采用平板-点接法测定重金属对菌株溶磷能力的影响;配制含终浓度 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cd}^{2+}$  的蒙金娜植酸钙培养基平板,于平板中央分别滴加 3  $\mu\text{L}$  不同菌株菌液,30  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 3 d 后观察生长和溶磷圈情况。

### 1.4 菌株 ZLT11 16S rRNA 基因序列分析

用细菌基因组提取试剂盒提取菌株 ZLT11 基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板,用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 及 1492R (5'-TACGGCTACCTTGT-TACGACTT-3') 进行 PCR 扩增,反应体系为 (10  $\mu\text{L}$ ): 正反向引物各 0.2  $\mu\text{L}$ , PCR 即用型预混液 (MasterMix) 5  $\mu\text{L}$ , 超纯水 (ddH<sub>2</sub>O) 3.6  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ; 扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min 30 s, 35 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切胶回收目标产物 (~1500 bp), 送上海生物工程股份有限公司广州测序部测序。所得序列在 NCBI 进行 BLAST 同源性搜索,并用核糖体在线归类系统进行属级或以上水平的归类;下载 NCBI 上已鉴定到种的高相似性序列, Clustal X 多重比对后运用 MEGA 5.05 软件构建 Neighbor-joining 系统树, bootstrap 1000 次检测各分支的置信值。

### 1.5 菌株 ZLT11 溶磷能力测定

菌株 ZLT11 于牛肉膏蛋白胨培养液中振荡培养 12 h 后, 8000 $\times g$  离心收集菌体,用灭菌超纯水洗涤 5 次,重悬于灭菌超纯水制成  $\text{OD}_{600} \approx 0.5$  的菌悬液。按 2% 体积将菌悬液接种于不同液体溶磷培养基中,以不接菌的同样培养基作为对照,30  $^{\circ}\text{C}$  180  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  培养 72 h 后, 8000 $\times g$  离心 15 min, 收集上清液并测定可溶性磷含量。计算溶磷量: 溶磷量 ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  可溶性磷) = 菌株 ZLT11 培养液中可溶性磷含量 - 未接菌培养液中可溶性磷含量。可溶性磷含量测定采用钼锑抗比色法<sup>[14]</sup>。每次测定 4 个重复。

1.6 培养温度、初始 pH 对菌株 ZLT11 生长及其溶磷量的影响试验

参照 1.5 方法将菌株 ZLT11 菌液接种于植酸钙溶磷培养液中,于不同温度(15、20、25、30、35、40 和 45 ℃)180 r · min<sup>-1</sup> 震荡培养,测定菌体生长量(OD<sub>600</sub>)及上清液中可溶性磷含量。配制初始 pH 为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0 和 11.0 的植酸钙溶磷培养液,参照同样方法测定初始 pH 对菌株 ZLT11 生长及其溶磷量的影响。以上每次测定均 4 个重复。

1.7 磷胁迫下菌株 ZLT11 对水稻的促生试验

参照 1.5 方法收集菌株 ZLT11 菌体,用灭菌超纯水洗涤 3 次后,重悬于灭菌 1/4 无磷 MS 培养液制成 OD<sub>600</sub> ≈ 1.0 的菌悬液(活菌数约为 10<sup>8</sup> CFU · mL<sup>-1</sup>)。挑选饱满健康的水稻(品种为黄花占)种子按照如下方法进行表面消毒:1%次氯酸钠 10 min,70%的酒精消毒 1 min,灭菌超纯水洗涤 5 次。将消毒的种子随机分为植酸钙添加组及植酸钙 + ZLT11 处理组。各组种子均放于培养皿中灭菌的无磷滤纸上萌发生长。在植酸钙添加组中的培养皿底部加入含有 0.2%植酸钙的灭菌 1/4 MS 无磷培养液;植酸钙 + ZLT11 处理组的培养皿中加入 2 mL ZLT11 菌悬液、2 mL 含 0.2%植酸钙的灭菌 1/4 无磷 MS 培养液。所有种子于(25±1) ℃光照培养箱中萌发、生长。每皿每两天补充 1 mL 同样溶液。7 d 后测定根长、根数、苗高及鲜重。各处理设 3 次重复,每个重复采用 3 个培养皿,每培养皿中 30 粒水稻种子。

1.8 重金属 Cd<sup>2+</sup> 胁迫下菌株 ZLT11 对水稻的促生试验

参照 1.7 方法进行种子消毒处理、菌株 ZLT11 菌悬液制备。将消毒的种子随机分为对照组、Cd<sup>2+</sup>

胁迫组和 Cd<sup>2+</sup>胁迫 + ZLT11 处理组。各组种子均放于培养皿中灭菌的滤纸上萌发生长。在对照组中,培养皿底部加入 4 mL 灭菌的 1/4 MS 培养液;Cd<sup>2+</sup>胁迫组的培养皿中则加入同样体积用 1/4 MS 培养液配制的 50 或 100 mg · L<sup>-1</sup> 的灭菌 Cd<sup>2+</sup> 溶液;Cd<sup>2+</sup>胁迫 + ZLT11 处理组的培养皿中加入 2 mL ZLT11 菌悬液及 2 mL 浓度为 50 或 100 mg · L<sup>-1</sup> 的灭菌 Cd<sup>2+</sup> 溶液。所有种子于同样条件下萌发和生长,并于 7 d 后测定根长、根数、苗高及鲜重。

1.9 数据处理

数据处理及画图采用 Excel 2016 软件进行,采用 SPSS 19 软件进行独立样本 T 检验和单因素 ANOVA 方差分析,多重比较采用 Dunnett 检验,进化树采用 MEGA 5.05 软件构建。

2 结果与分析

2.1 菌株 ZLT11 的筛选

采用添加植酸钙的溶磷菌选择培养基,从薇甘菊根际土壤中共分离到 42 株具有明显溶磷圈的细菌,其中,菌株 ZLT11 溶磷圈直径/菌落直径达到(2.65±0.13)(图 1A)。在添加 100 mg · L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> 的蒙金娜植酸钙平板上,该菌株仍然显示了较大的溶磷圈(图 1B),说明该菌株在 Cd 胁迫下仍能发挥较好的溶磷作用。重金属耐受测定结果显示该菌株能耐受 400 mg · L<sup>-1</sup> Pb<sup>2+</sup>、100 mg · L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> 和 40 mg · L<sup>-1</sup> Hg<sup>2+</sup>(图 1C)。菌株 ZLT11 显示了较高的溶磷能力及多重金属抗性,该菌株被选择进行进一步研究。

2.2 菌株 ZLT11 16S rRNA 基因序列分析

相似性搜索显示菌株 ZLT11 16S rRNA 基因序列(GenBank 序列号为 MN027922)与 NCBI 中类芽孢杆菌(*Paenibacillus* spp.)相应序列相似性最高,最

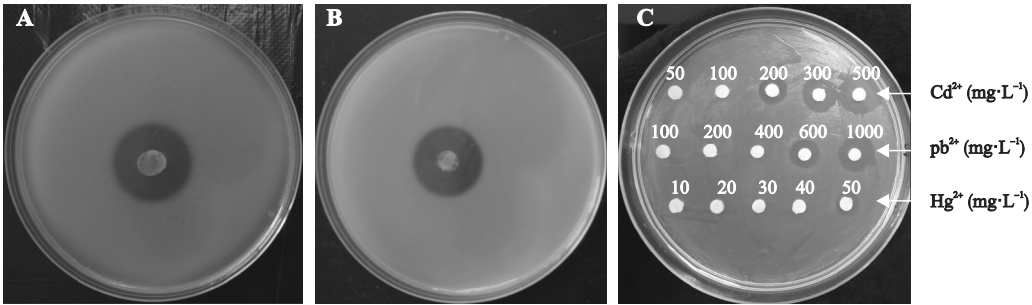


图 1 菌株 ZLT11 的溶磷能力(A 和 B)及重金属耐受(C)测定

Fig.1 Detection of phosphate-solubilizing capability (A and B) and heavy metal-tolerance (C) of strain ZLT11.

A 和 B 分别显示菌株 ZLT11 在不含或含 Cd<sup>2+</sup> 的植酸钙培养基中所形成的溶磷圈 A and B showed the phosphate-solubilizing circle produced by the strain ZLT11 at the calcium phytate medium plate without or with the addition of Cd<sup>2+</sup>, respectively.



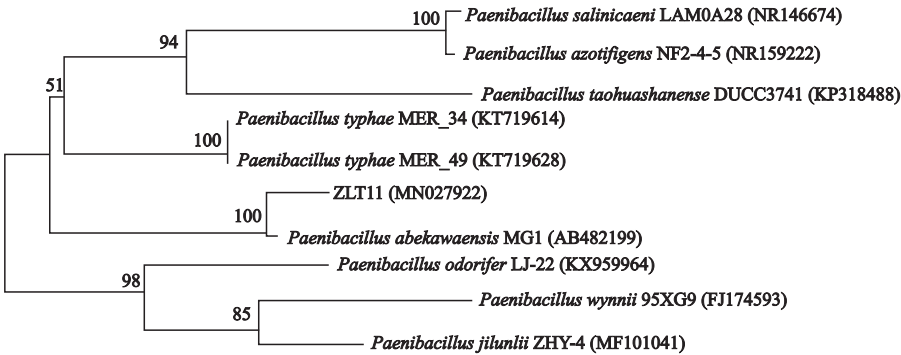


图 2 菌株 ZLT11 16S rRNA 基因序列 Neighbor-joining 进化树

Fig.2 16S rRNA genes sequence-based Neighbor-joining phylogenetic tree of strain ZLT11.

分支上的数据表示自展 1000 次的支持百分率 Numbers at each branch point indicated the percentage supported by bootstrap values based on 1000 replications; 括号内为菌株的 GenBank 序列号 GenBank accession numbers were shown in the parentheses.

高达 99.4%。核糖体在线归类分析显示该菌株以 100%置信度归于类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus*)。下载 NCBI 中已鉴定到种的高相似性序列,用 MEGA 5.05 软件构建 N-J 进化树,结果显示,菌株 ZLT11 以 100%支持率与 *P. abekawaensis* 菌株 MG1 位于同一分支(图 2),故菌株 ZLT11 初步命名为 *P. abekawaensis* 菌株 ZLT11。

2.3 菌株 ZLT11 对不同磷化合物的溶磷能力测定

由表 1 可以看出,菌株 ZLT11 在不同溶磷培养基中的溶磷能力随含磷物质不同而异,以对植酸钙的溶磷能力最强,其次为植酸,在含该两种植酸磷的培养基中溶磷量均接近或超过 80 mg · L<sup>-1</sup>。但该菌株对其他几种测试的磷化合物的溶磷能力较弱,其溶磷量均低于 20 mg · L<sup>-1</sup>。各培养液中 pH 均下降到 4.5 左右,说明该菌具有较强的产酸能力。

2.4 温度和初始 pH 对菌株 ZLT11 生长和溶磷能力的影响

以植酸钙溶磷培养基为例,研究温度和初始 pH

对菌株 ZLT11 生长和溶磷能力的影响。从图 3 可以看出,在测试的温度范围内 (15 ~ 45 °C),菌株 ZLT11 均能生长。在该范围内,随着温度的升高,其生长和溶磷能力均呈现先升高后降低的变化趋势,其生长和溶磷量均以 30 °C 最高,分别为 0.93 和 77.83 mg · L<sup>-1</sup>。初始 pH 4.0 ~ 11.0 范围内,菌株 ZLT11 均能生长,生长量以初始 pH 7.0 最高,而溶磷能力在初始 pH 9.0 时最强,此条件下溶磷量高达 95.66 mg · L<sup>-1</sup>。

2.5 植酸钙为磷源下菌株 ZLT11 对水稻的促生效应

由表 2 可以看出,ZLT11+植酸钙组水稻幼苗其测定的各种生长指标均显著高于仅添加植酸钙而未接种该菌株的对照幼苗,其中根长、根数、苗高和鲜

表 1 菌株 ZLT11 在不同溶磷培养基中的溶磷能力测定  
Table 1 Detection of P-solubilizing capability of strain ZLT11 in different P-containing media (mean±SD)

溶磷培养基 P-solubilizing medium	溶磷量 P-solubilizing capability (mg · L <sup>-1</sup> )	pH
植酸钙培养基 Calcium phytate medium	87.10±2.23	4.39±0.14
植酸培养基 Phytic acid medium	74.84±4.36	4.44±0.01
卵磷脂培养基 Lecithin medium	13.28±0.79	4.48±0.01
磷酸钙培养基 Calcium phosphate medium	16.76±0.76	4.59±0.01
磷酸铁培养基 Ferric phosphate medium	5.57±0.14	5.06±0.01
磷矿粉培养基 Phosphate rock powder medium	0.38±0.02	4.81±0.02

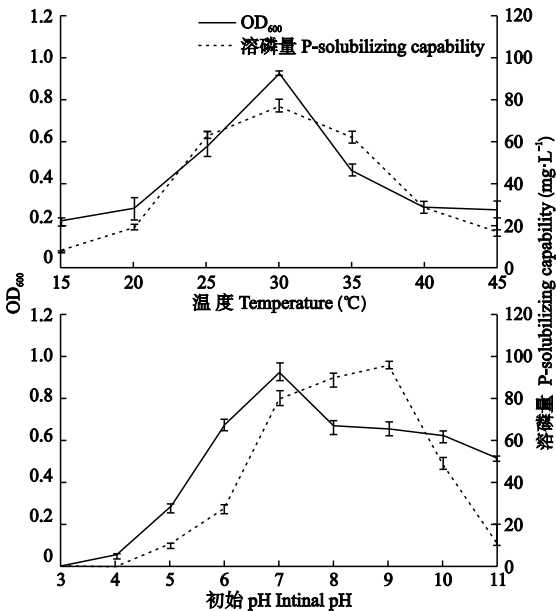


图 3 温度和初始 pH 对菌株 ZLT11 生长及溶磷能力的影响  
Fig.3 Effect of temperature and initial pH on growth and P-solubilizing capability of strain ZLT11.

表 2 植酸钙为磷源下菌株 ZLT11 对水稻幼苗的促生效应  
Table 2 Growth-promoting effect of strain ZLT11 on rice seedling with calcium phytate as phosphorus source (mean±SD)

处理 Treatment	根长 Root length (cm)	根数 Total root numbers	苗高 Seedling height (cm)	鲜重 Biomass (mg)
植酸钙 Calcium phytate	4.75±0.32b	7.05±0.73b	5.49±0.62b	53.85±1.93b
ZLT11+植酸钙 ZLT11+Calcium phytate	9.82±1.21a	12.45±0.58a	8.18±0.31a	78.80±2.92a

同列不同字母表示差异显著 ( $P<0.05$ ) Different letters in the same column meant significant difference at 0.05 level. 下同 The same below.

重较对照分别增加了 106.7%、76.6%、49.0% 和 46.3%,说明菌株 ZLT11 能通过对植酸钙的溶磷作用有效促进测试幼苗的生长。

2.6 重金属  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下菌株 ZLT11 对水稻的促生效应

由表 3 可知,重金属  $\text{Cd}^{2+}$  在测试的 2 个浓度 ( $50$ 、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 下均显著抑制水稻幼苗生长,在培养液中添加  $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Cd}^{2+}$  后,其根长、根数、苗高和鲜重均较对照组幼苗分别减少了 22.6%、22.2%、12.4% 和 7.1%;而添加  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{Cd}^{2+}$  后,其根长、根数、苗高和鲜重较对照组幼苗分别减少了 20.2%、51.1%、18.0% 和 14.4%。在用菌株 ZLT11 处理的两组水稻幼苗中,除  $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}^{2+}$  中根长增加不显著外,其他测定的各项生长指标均显著高于仅在同样 Cd 胁迫条件下生长的水稻幼苗。说明菌株 ZLT11 能有效提高水稻幼苗在 Cd 胁迫下的生长能力。

表 3 重金属  $\text{Cd}^{2+}$  胁迫下菌株 ZLT11 对水稻幼苗的促生效应  
Table 3 Growth-promoting effect of strain ZLT11 on rice seedling under  $\text{Cd}^{2+}$  stress

处理 Treatment	根长 Root length (cm)	根数 Total root numbers	苗高 Seedling height (cm)	鲜重 Fresh weight (mg)
对照 Control	2.92±0.09a	9.0±0.00a	5.82±0.19a	54.65±1.85a
$50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}$	2.26±0.21c	7.0±0.00d	5.10±0.13c	50.75±1.08b
$50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd} + \text{ZLT11}$	2.90±0.29a	8.3±0.45b	5.49±0.22b	54.60±2.59a
$100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd}$	2.33±0.19bc	4.4±0.48e	4.77±0.21d	46.80±2.30b
$100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Cd} + \text{ZLT11}$	2.41±0.22b	8.0±0.00c	5.51±0.29b	51.10±3.52c

3 讨 论

目前,有关溶磷细菌相关研究很多,但大多针对难溶性无机磷开展<sup>[4,6,15]</sup>,土壤有机磷占土壤全磷的 20%~50%,有些土壤甚至高达 80%<sup>[16]</sup>。土壤有机磷化合物主要以肌醇磷酸盐、磷脂、核酸等形式存

在,其中 60%~80% 为肌醇六磷酸(植酸)及其盐类<sup>[17-18]</sup>。植酸也是重要的抗营养因子,饲料中添加植酸酶或产植酸酶的微生物可显著提高饲料的营养价值<sup>[19-20]</sup>。研究也显示植物过表达细菌植酸酶基因能显著促进其磷吸收和生长<sup>[16]</sup>。为此,本研究重点开展溶植酸磷细菌筛选及其相关研究。

迄今为止,见诸报道的植酸磷降解细菌主要集中在芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)等少数几个属<sup>[7,18]</sup>。本研究中,溶磷细菌菌株 ZLT11 经 16S rRNA 基因序列分析初步鉴定为类芽孢杆菌。目前类芽孢杆菌溶磷作用特别是对有机磷的溶磷作用相关研究鲜有报道。溶磷细菌的溶磷能力在不同菌株之间有较大差异,如 Tao 等<sup>[21]</sup>从土壤中分离出 10 株具有解磷活性的蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)和巨大芽孢杆菌(*B. megatherium*),在培养条件下对有机磷的溶磷量为  $13.8\sim62.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  有效磷;卫星等<sup>[22]</sup>从盐渍化土壤中筛选得到的巨大芽孢杆菌对植酸钙的溶磷量为  $68\sim98\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ;Ghosh 等<sup>[23]</sup>的研究显示 4 株溶磷细菌从植酸钠及植酸铁中释放的可溶性磷均低于  $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本研究中,菌株 ZLT11 对植酸磷的溶磷量最高达到  $95.66\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,这提示类芽孢杆菌作为溶磷细菌值得关注。本研究菌株 ZLT11 不仅具有较高的溶磷能力,对重金属 Pb、Cd、Hg 表现出了较高的耐受性,这提示该菌株是重金属污染土壤促生菌剂的优良候选。

温度和 pH 是影响生长和代谢的最重要因素。本研究中该菌株在测试的温度范围内( $15\sim45\text{ }^{\circ}\text{C}$ )均能生长和溶磷,同时该菌株也具有极宽的 pH 耐受性,这是该菌株作为促生菌剂的另一优势。研究显示碱性条件可促进有机磷的酶促矿化<sup>[7,24]</sup>,与这些研究一致,本研究同样发现菌株 ZLT11 在 pH 为 9.0 时溶磷活性最高。利用溶磷菌改良盐碱土壤以及促进植物生长的研究已有报道,如胡山等<sup>[25]</sup>发现某些溶磷菌株可提高碱化土壤质量水平。本研究菌株虽然在实验室碱性条件下显示了溶磷活性,但在实际的碱性土壤中效果如何还有待进一步研究。

我国水稻土特别是亚热带地区水稻土普遍受磷限制<sup>[26]</sup>。目前报道较多的水稻根际溶磷促生菌主要为芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、土壤杆菌(*Agrobacterium* spp.)等<sup>[27-28]</sup>,而对类芽孢杆菌并无相关报道。本研究以水稻为测试植物,初步探讨了类芽孢杆菌 ZLT11 的溶磷和促生效应。结果显示,添加植酸钙同时接种菌株 ZLT11 后,水稻幼苗平均根长、根数、

苗高及总生物量均极显著高于仅添加植酸钙对照幼苗,说明菌株 ZLT11 能通过对植酸钙的溶磷作用增加培养液中有效 P 含量,进而有效促进测试幼苗的生长。

镉(Cd)是一种常见的、毒性非常强的重金属,镉不仅阻碍水稻幼苗根生长<sup>[29]</sup>,也抑制光合作用等重要过程<sup>[30]</sup>。本研究 Cd 胁迫下添加菌株 ZLT11 的水稻幼苗其生长各项指标均显著高于同样胁迫下未接种幼苗,说明菌株 ZLT11 能有效缓解 Cd 对水稻幼苗的胁迫。重金属耐受促生菌促进植物在重金属污染土壤中的生长涉及对重金属的吸附、吸收和转化等多种机制<sup>[8,10]</sup>,菌株 ZLT11 通过怎样的机制来减轻 Cd 对水稻幼苗的毒害有待进一步研究。研究显示,解磷微生物释放的磷素也可直接与土壤重金属形成络合物,从而降低土壤中重金属活性及移动性,因而在实际土壤条件下该菌株对土壤重金属毒害的缓解作用可能更高,这有待于进一步研究。

## 4 结 论

从薇甘菊分离得到的类芽孢杆菌菌株 ZLT11 具有较高的溶植酸磷活性及多重金属抗性,也具有较广的温度和 pH 耐受性。在试验条件下,不仅能明显促进磷限制下水稻幼苗的生长,也能有效缓解 Cd 对水稻幼苗的胁迫,是促生菌剂特别是重金属污染土壤促生菌剂的优良候选。在后续工作中,一方面应对该菌株的生长特性、溶磷条件、溶磷机理等进行深入细致的研究,另一方面对该菌株在土壤条件下的促生效应、土壤定植特征及其影响因素等进行更大范围、更为细致的研究。

## 参考文献

- [1] Schroder JJ, Smit AL, Cordell D, *et al.* Improved phosphorus use efficiency in agriculture: A key requirement for its sustainable use. *Chemosphere*, 2011, **84**: 822–831
- [2] Adhya TK, Kumar N, Reddy G, *et al.* Microbial mobilization of soil phosphorus and sustainable P management in agricultural soils. *Current Science*, 2015, **108**: 1280–1287
- [3] 宋春, 韩晓增. 长期施肥条件下土壤磷素的研究进展. *土壤*, 2009, **41**(1): 21–26 [Song C, Han X-Z. Advances in phosphorus in long-term fertilized soil. *Soils*, 2009, **41**(1): 21–26]
- [4] Satyaprakash M, Nikitha T, Reddi EUB, *et al.* Phosphorous and phosphate solubilizing bacteria and their role in plant nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*, 2017, **6**: 2133–2144
- [5] 王亚艺. 使用解磷细菌对小油菜产量及土壤磷含量的影响. *北方园艺*, 2014(5): 155–158 [Wang Y-Y. Effect of P solubilizing bacteria on rape yield and the content of soil phosphorus. *Northern Horticulture*, 2014(5): 155–158]
- [6] 冯哲叶, 陈莎莎, 王文超, 等. 几株溶磷细菌的筛选和鉴定及其溶磷效果. *南京农业大学学报*, 2017, **40**(5): 842–849 [Feng Z-Y, Chen S-S, Wang W-C, *et al.* Screening and identification of several phosphate-solubilizing bacteria and effect of their P-solubility. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, **40**(5): 842–849]
- [7] 李韵诗, 冯冲凌, 吴晓芙, 等. 重金属污染土壤植物修复中的微生物功能研究进展. *生态学报*, 2015, **35**(20): 6881–6890 [Li Y-S, Feng C-L, Wu X-F, *et al.* A review on the functions of microorganisms in the phytoremediation of heavy metal-contaminated soils. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, **35**(20): 6881–6890]
- [8] 黄明煜, 章家恩, 全国明, 等. 土壤重金属的超富集植物研发利用现状及应用入侵植物修复的前景综述. *生态科学*, 2018, **37**(3): 194–203 [Huang M-Y, Zhang J-E, Quan G-M, *et al.* Review on research and utilization current status of hyperaccumulation plants for heavy metal contaminated soils and the phytoremediation application prospective of invasive plants. *Ecological Science*, 2018, **37**(3): 194–203]
- [9] 李敏, 滕泽栋, 朱静, 等. 解磷微生物修复土壤重金属污染研究进展. *生态学报*, 2018, **38**(10): 3393–3402 [Li M, Teng Z-D, Zhu J, *et al.* Research advances in heavy metal contaminated soil remediation by phosphate solubilizing microorganisms. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, **38**(10): 3393–3402]
- [10] Pikovskaya RI. Mobilization of phosphorus in soils in connection with vital activity of some microbial species. *Microbiology*, 1948, **17**: 362–370
- [11] 杜连祥, 路福平. 微生物学实验技术. 北京: 中国轻工业出版社, 2005 [Du L-X, Lu F-P. *Experimental Technique in Microbiology*. Beijing: China Light Industry Press, 2005]
- [12] 王玉英. MS 培养基的配制方法. *植物杂志*, 1983(5): 15 [Wang Y-Y. The preparation method of MS medium. *Plants*, 1983(5): 15]
- [13] 卞光凯, 张越己, 秦盛, 等. 南通沿海滩涂耐盐植物重金属抗性内生细菌的筛选及生物多样性. *微生物学报*, 2011, **51**(11): 1538–1547 [Bian G-K, Zhang Y-J, Qin S, *et al.* Isoation and biodiversity of heavy metal tolerant endophytic bacteria from halotolerant plant species located in coastal shoal of Nantong. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, **51**(11): 1538–1547]
- [14] 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. *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. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2012, **23**(1): 235–239]
- [15] 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. *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 characteristic of *Rahnella* sp. phosphate-solubilizing bacteria in calcareous soil. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, **24**(8): 2294-2300]
- [16] 张宝贵, 李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的应用. 土壤学报, 1998, **35**(1): 104-110 [Zhang B-G, Li G-T. Application of soil organisms in soil phosphorus efficiency. *Acta Pedologica Sinica*, 1998, **35**(1): 104-110]
- [17] Belgaroui N, Berthomieu P, Rouached H, *et al.* The secretion of the bacterial phytase PHY-US 417 by *Arabidopsis roots* reveals its potential for increasing phosphate acquisition and biomass production during crop growth. *Plant Biotechnology Journal*, 2016, **14**: 1914-1924
- [18] Sanguin H, Wilson NL, Kertesz MA. Assessment of functional diversity and structure of phytate-hydrolyzing bacterial community in *Lolium perenne* rhizosphere. *Plant and soil*, 2016, **401**: 151-167
- [19] 贺建华. 植酸磷和植酸酶研究进展. 动物营养学报, 2005, **17**(1): 1-6 [He J-H. Recent advances in phytate and phytase studies. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2005, **17**(1): 1-6]
- [20] El-Hack MEA, Alagawany M, Arif M, *et al.* The uses of microbial phytase as a feed additive in poultry nutrition: A review. *Annals of Animal Science*, 2018, **18**: 639-658
- [21] Tao GC, Tian SJ, Cai MY, *et al.* Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. *Pedosphere*, 2008, **18**: 515-523
- [22] 卫星, 徐鲁荣, 张丹, 等. 一株耐硝酸盐的巨大芽孢杆菌溶磷特性研究. 环境科学学报, 2015, **35**(7): 2052-2058 [Wei X, Xu L-R, Zhang D, *et al.* Phosphate solubilizing characteristics of a nitrate-tolerating bacterium, *Bacillus megaterium*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, **35**(7): 2052-2058]
- [23] Ghosh S, Goswami AJ, Phukan I, *et al.* Evaluating ability of indigenous phytate-solubilizing microorganisms to hydrolyze iron phytate for releasing inorganic phosphate in synthetic medium. *Two and a Bud*, 2016, **63**: 17-20
- [24] 李楠, 单保庆, 张洪, 等. 沉积物中有机磷在 pH 和温度影响下的矿化机制. 环境科学, 2011, **32**(4): 1008-1014 [Li N, Shan B-Q, Zhang H, *et al.* Organic phosphorus mineralization in the sediments under the impact of pH and temperature. *Environmental Science*, 2011, **32**(4): 1008-1014]
- [25] 胡山, 牛世全, 龙洋, 等. 河西走廊盐碱土壤中一株高效溶磷菌的鉴定及条件优化. 微生物学通报, 2017, **44**(2): 358-365 [Hu-S, Niu S-Q, Long Y, *et al.* Identification of an efficient phosphorus solubilizing bacteria from saline-alkali soil in the Hexi Corridor and optimization of its condition. *Microbiology China*, 2017, **44**(2): 358-365]
- [26] 向万胜, 童成立, 吴金水, 等. 湿地农田土壤磷素的分布形态与有效性及磷素循环. 生态学报, 2001, **21**(12): 2067-2073 [Xiang W-S, Tong C-L, Wu J-S, *et al.* Chemical forms, availability and cycling of soil phosphorus in wetland farming systems. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**(12): 2067-2073]
- [27] 刘泽平, 王志刚, 徐伟慧, 等. 水稻根际促生菌的筛选鉴定及促生能力分析. 农业资源与环境学报, 2018, **35**(2): 119-125 [Liu Z-P, Wang Z-G, Xu J-H, *et al.* Screen, identification and analysis on the growth-promoting ability for the rice growth-promoting rhizobacteria. *Journal of Agricultural Resources and Environment*, 2018, **35**(2): 119-125]
- [28] 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. 合肥工业大学学报: 自然科学版, 2011, **34**(2): 304-308 [Tao T, Ye M, Liu D, *et al.* On isolation and identification of inorganic phosphorus bacteria and its phosphate-solubilizing capacity. *Journal of Hefei University of Technology: Natural Science*, 2011, **34**(2): 304-308]
- [29] 曾翔, 张玉烛, 王凯荣, 等. 镉对水稻种子萌发的影响. 应用生态学报, 2007, **18**(7): 1665-1668 [Zeng X, Zhang Y-Z, Wang K-R, *et al.* Effects of cadmium on rice seed germination. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, **18**(7): 1665-1668]
- [30] Yu CL, Sun CD, Shen C, *et al.* The auxin transporter, Os AUX 1, is involved in primary root and root hair elongation and in Cd stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). *The Plant Journal*, 2015, **83**: 818-830

作者简介 渠露露, 女, 1993 年生, 硕士研究生。主要从事入侵植物土壤微生物研究。E-mail: qlq1212@163.com

责任编辑 肖红

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



渠露露, 彭长连, 李淑彬. 一株溶植酸磷类芽孢杆菌的分离筛选及对水稻幼苗的促生作用. 应用生态学报, 2020, **31**(1): 326-332

Qu L-L, Peng C-L, Li S-B. Isolation and screening of a phytate phosphate-solubilizing *Paenibacillus* sp. and its growth-promoting effect on rice seedling. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, **31**(1): 326-332