

# 羊草和星星草根际溶磷菌溶磷能力及菌株特性

邓小宇<sup>1</sup>, 朱瑞芬<sup>2</sup>, 唐凤兰<sup>2</sup>, 刘杰淋<sup>2</sup>, 张强<sup>2</sup>, 陈积山<sup>2</sup>

(1. 哈尔滨师范大学, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 黑龙江省农业科学院 草业研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**摘要:**为促进松嫩草地微生物深度开发和利用, 采用 PKO 无机磷培养基, 从羊草(*Leymus chinensis*)和星星草(*Puccinellia tenuiflora*)根际分离获得具有溶磷能力的菌株, 对菌株采用溶磷圈法和钼蓝比色法进行溶磷水平测定。结果表明: 筛选菌株对磷酸钙的分解能力差异较大( $P < 0.05$ ), 其溶磷量为  $7.60 \sim 348.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 筛选菌株的溶磷量与分泌有机酸量、培养基质 pH 都不存在显著的相关性( $P > 0.05$ ); 筛选菌株都可以分泌生长素, 生长素分泌量介于  $11.00 \sim 16.55 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 大多数菌落呈淡黄色或乳白色、不规则、不透明、扁平、无色素。

**关键词:**羊草; 星星草; 溶磷量; pH; 分泌有机酸

**中图分类号:** S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2017)02-0063-05 DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2017.02.0063

植物的生长发育离不开磷元素, 但其对土壤中磷的当季利用率仅为  $5\% \sim 25\%$ <sup>[1]</sup>。主要原因是大部分磷和土壤里的金属离子螯合形成了于植物生长不利的难溶性物质<sup>[2]</sup>。如何改变这种土壤有效磷的利用现状, 成为最近 10 年相关学科关注的热点。研究表明具有溶磷能力的微生物能把土壤中大量存在的难溶性磷酸盐转变成为可溶性物质有利于植物吸收及利用, 并能有助于植物对营养元素的利用, 进而利于植物的生长。因此, 展开对于溶磷菌的研究和利用对改变土壤有效磷元素缺乏的现状有着重要的意义, 而植物根际高效溶磷微生物的筛选尤为重要。

羊草以及星星草是松嫩草地非常重要的两个优势牧草品种。这两种牧草市场需求量较大, 连年刈割导致大量磷素移出草地, 土壤磷素不足, 生物量逐年降低, 解磷微生物的应用是有望解决这一问题的有效途径之一<sup>[3]</sup>。国内外研究证实, 部分降低, 从而提高根际的可溶性磷含量<sup>[4-8]</sup>。本文以松嫩草地羊草和星星草根际微生物溶磷能力为试验对象, 旨在探讨松嫩草地的养分供给机制, 为减少环境污染, 生态保护, 促进畜牧业健康发展提

供一定依据。本试验通过分离筛选羊草和星星草根际高效溶磷菌, 为制备羊草和星星草高效根际复合接菌剂提供优异菌种, 实现松嫩草地微生物深度开发。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采样地点位于黑龙江省草业研究所兰西试验基地。该地区主要土地类型为盐碱化草甸土, pH8.00~9.00。主要植被类型为中生或旱生禾本科植物, 群落以羊草群落占绝对优势。试验区全年禁牧。2015 年试验地土壤初始理化性质测定土壤 pH8.12, 土壤有机质含量 3.04%, 土壤全氮含量 0.04%, 土壤硝态氮和铵态氮分别为 2.35 和  $7.81 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。2015 年 7-8 月以 5 点法取样, 获得附带土壤的羊草和星星草健康根系, 按常规方法装入标记好的无菌封口袋, 于  $4^\circ\text{C}$  低温保存, 然后拿回实验室对溶磷菌进行分离。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养基选择** 采用 PKO 固体培养基分离溶磷菌菌株<sup>[9]</sup>, 用阿须贝培养基测定 3-吲哚乙酸(IAA)的量<sup>[10]</sup>, PKO 培养液测定溶解磷的量和有机酸分泌量。

**1.2.2 溶磷菌分离筛选** 对收集的羊草和星星草根系进行土壤清理, 按照常规细菌分离法, 在 PKO 固体培养基上培养出菌落, 选择有明显溶磷圈的单菌落进行挑取, 纯化后保存于 LB 试管斜面( $4^\circ\text{C}$ )。用点接种法将纯分离物接种于 PKO

收稿日期: 2017-01-04

基金项目: 黑龙江地区苜蓿高效种植技术与示范资助项目(201403048)

第一作者简介: 邓小宇(1991-), 女, 黑龙江省安达市人, 在读硕士, 从事牧草遗传育种研究。E-mail: 1533100992@qq.com。

通讯作者: 唐凤兰(1963-), 女, 辽宁省宽甸县人, 学士, 研究员, 从事豆科牧草遗传育种研究。E-mail: nkypzk@qq.com。

固体培养基上,放于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 10 d,测定菌落直径和溶磷圈直径,根据比值大小从而初步确定各菌株溶磷水平。

1.2.3 溶解磷酸钙能力和分泌有机酸能力的测定 使用钼锑抗比色法进一步测定各菌株培养液上清液含有磷的量<sup>[10]</sup>。

1.2.4 分泌 IAA 性能测定 加入 PC 比色液,根据各菌液颜色的改变,测定菌株生长素的分泌强度<sup>[11]</sup>。采用紫外可见分光光度计(波长 530 nm)测定比色液的 OD 值,按照标准曲线算出菌液中生长素分泌量。

1.2.5 菌落特征观察 将菌株接种于 PKO 固体培养基后放于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 24~48 h,观察,记录主要菌落的形态特征。

1.2.6 数据处理 数据处理使用 SPSS17.0 软件作方差分析,各处理间采用的是 LSD 法进行多重比较。相关关系采用 Pearson 相关统计分析。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌的筛选结果

2.1.1 初筛 溶磷圈直径(D)和菌落直径(d)之间的比值(D/d)是描述溶磷菌相对溶磷水平的一个重要指标。在 27 个具有明显的溶磷圈的菌落中 S1~S20 是分离自羊草根际的,S21~S27 是分离自星星草根际的,分离自羊草根际且溶磷能力最强的有 1 株(D/d 值≥4.00),占有菌株数量的 3.70%。溶磷效果好的有 3 个(4>D/d≥2.50),占 11.11%;溶磷效果较好的有 15 个(2.50>D/d≥1.50),占 55.56%;溶磷效果较差的有 1 个(D/d<1.5),占 3.7%。分离自星星草根际且菌株的溶磷能力较差(D/d<1.5)共有 7 株,但没有分离出溶磷能力强的菌株(见表 1)。通过对 D/d 的观察,初步确定 D/d 值均大于 2.00 的 S1~S12 菌株溶磷效果比较好。

2.1.2 复选 由表 2 可知,上清液有效磷增量大于 150.00 mg·L<sup>-1</sup>的共 4 个菌株,占溶磷细菌总数 14.81%。其中 S19 菌株溶磷效果最好,溶磷含量为 348.13 mg·L<sup>-1</sup>,其次为 S5 号菌株,溶磷量为 232.38 mg·L<sup>-1</sup>,而 S16 菌株溶磷效果最差,其溶磷量为-7.60 mg·L<sup>-1</sup>。结果也表明,菌株溶磷水平在液体培养基培养条件下与固体培养基培养条件下的结果不完全相同。对同一菌株而言,D/d 的值越大,并不代表其在液体培养基培养条件下

分解无机磷能力就强。例如分离自羊草根际的菌株 S1,其 D/d 的值最大,但它的溶解磷能力却为 17.32 mg·L<sup>-1</sup>。无独有偶,分离自星星草根际的菌株 S25,其 D/d 的值只有 1.17,但它的溶磷能力竟达 201.80 mg·L<sup>-1</sup>。

表 1 不同菌株 D/d 值  
Table 1 D/d of different strains

菌株编号 Strains code	直径比 Diameter ratio(D/d)	菌株编号 Strains code	直径比 Diameter ratio(D/d)
S1	5.00	S15	1.83
S2	3.00	S16	1.79
S3	2.56	S17	1.67
S4	2.50	S18	1.58
S5	2.42	S19	1.55
S6	2.40	S20	1.40
S7	2.40	S21	1.33
S8	2.25	S22	1.33
S9	2.25	S23	1.27
S10	2.25	S24	1.22
S11	2.00	S25	1.17
S12	2.00	S26	1.11
S13	1.95	S27	1.00
S14	1.90		

2.2 溶磷量与 pH 关系

菌株分泌有机酸的量在 14.01~17.10 mmol·L<sup>-1</sup>(见表 2),其中 S5 菌株分泌有机酸的量最少,但其溶磷能力却最强;菌株 S16 分泌有机酸量相对较高,但其溶磷能力却为最低。统计结果表明,27 株溶磷菌泌酸的含量和溶磷量之间未发现有显著相关性(r=0.32,P=0.52>0.05),由此可以推断泌酸量并不能够全面反映溶磷菌株的溶磷水平。和未接种培养液(pH 7.00)比较,接种菌株的培养液 pH 具有下降的趋势,显示这些菌株在培养的过程中分泌弱酸性物质。同时,通过线性回归得到分析结果,27 株溶磷菌株的有效溶磷含量(y)和培养液的 pH(x)二者之间存在线性相关关系,y=-73.171x+508.78,但没有统计学意义(r=0.25,R<sup>2</sup>=0.37)。同时将来自羊草和星星草根际菌株的有效溶磷含量(y)与培养液的 pH(x)分别作线性回归分析,结果表明这种线性负相关关系在两个物种上仍然不显著(见图 1 和图 2)。

综合上述分析,溶磷菌溶磷能力并不是完全取决于培养过程里有机酸的分泌量与 pH 的变化。

表 2 不同的菌株溶磷能力、pH 和总的有机酸分析

Table 2 Capacity of dissolving phosphorus and pH of different strains			
菌株编号 Strains code	溶磷量/ (mg·L <sup>-1</sup> ) Capacity of dissolving phosphorus	pH	总有机酸/ (mmol·L <sup>-1</sup> ) Total organic acid
S1	17.32±5.19	6.14±0.06	16.04±0.01
S2	15.67±12.71	5.83±0.10	15.13±0.10
S3	13.41±5.31	6.02±0.24	16.02±0.20
S4	18.30±8.49	6.05±0.04	16.00±0.00
S5	232.38±8.71	4.91±0.39	14.01±0.39
S6	11.66±16.14	6.52±0.15	16.12±0.10
S7	80.60±9.40	5.58±1.11	15.08±1.10
S8	0.28±3.01	5.59±0.48	15.00±0.40
S9	28.69±9.92	6.94±0.06	16.04±0.06
S10	10.49±6.71	5.65±0.56	15.00±0.56
S11	18.28±8.45	7.08±0.06	17.08±0.01
S12	6.43±4.90	6.77±0.06	16.11±0.06
S13	39.82±9.69	7.17±0.05	17.10±0.01
S14	48.03±18.97	6.35±0.18	16.15±0.11
S15	10.90±6.28	6.80±0.06	16.00±0.01
S16	-7.60±0.25	6.23±0.23	16.00±0.21
S17	32.41±8.14	7.17±0.08	17.00±0.01
S18	84.19±14.42	6.10±0.08	16.10±0.01
S19	348.13±18.75	5.06±0.60	15.00±0.10
S20	19.73±5.87	5.97±0.33	15.00±0.31
S21	167.39±6.54	6.52±0.23	16.00±0.21
S22	30.81±16.85	6.18±0.07	16.15±0.01
S23	50.26±7.21	6.22±0.25	16.00±0.21
S24	48.13±3.89	6.00±0.20	16.00±0.21
S25	201.80±2.77	4.38±0.63	14.11±0.13
S26	3.90±4.10	7.00±0.02	17.00±0.01
S27	37.66±9.89	5.96±0.20	15.96±0.21

2.3 定量和定性检测

定量和定性测定菌株分泌生长素结果见表 3。定量测定表明,菌株 S13、S14、S15、S22、S25、S26、S27 显色反应不太明显,菌株 S1、S17、S18、S19、S20 显色反应为深粉红色,其余显色反应为粉红色。定量测定菌株分泌生长素的量在 11.00~16.55 mg·L<sup>-1</sup>,菌株 S19 分泌生长素的量最大,分泌生长素的量最小为 S27。多数菌株生长素的分泌量的定性测定和定量测定基本一致。

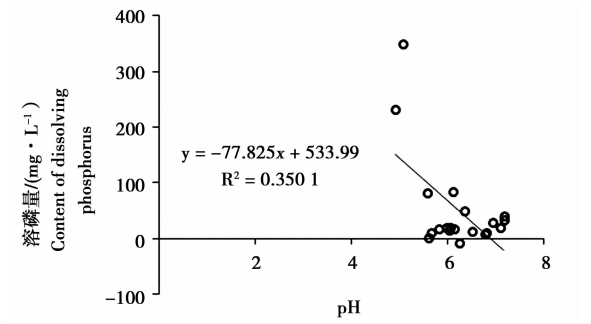


图 1 羊草根际菌株有效溶磷量与 pH 的关系  
Fig.1 The relationship of rhizosphere strains between the effective content of the phosphorus solution and pH in *Leymus chinensis*

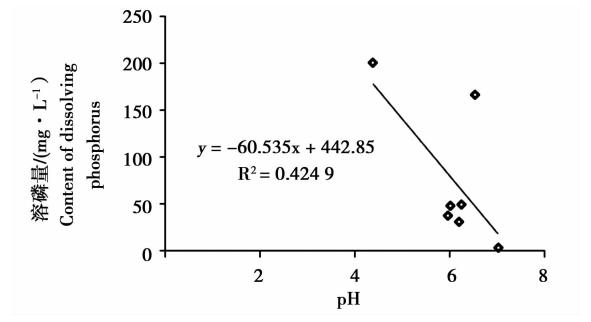


图 2 星星草根际菌株有效溶磷量与 pH 的关系  
Fig.2 The relationship of rhizosphere strains between the effective content of the phosphorus solution and pH in *Puccinellia tenuiflora*

2.4 溶磷菌菌落特性

选用 PKO 培养基对经过筛选得到的菌落进行纯培养,观察其在培养基上的菌落特征,结果如表 4,各菌株菌落形状呈圆形或不规则形状;除菌株 S2、S4、S6、S22、S24、S26 为透明的,其它菌落均为不透明的;除 S1、S3、S5、S7、S13、S18、S23 为菌落颜色呈乳白色,其它均呈淡黄色;各菌株菌落均属于半湿润状态且高度都属于扁平的,没有凸起;菌株 S1、S3、S5、S7、S13、S18、S23 边缘整齐,其它为锯齿状。

表 3 菌株生长素分泌能力的定性和定量检测

Table 3 Qualitative and quantitative detection of IAA secretion capacity of different strains

菌株编号	颜色反应	IAA/(mg·L <sup>-1</sup> )	菌株编号	颜色反应	IAA/(mg·L <sup>-1</sup> )
Strains code	Color reaction	IAA	Strains code	Color reaction	IAA
S1	+++	14.30	S15	—	11.43
S2	++	13.00	S16	++	13.90
S3	++	13.56	S17	+++	15.70
S4	++	13.50	S18	+++	15.08
S5	++	13.42	S19	+++	16.55
S6	++	12.90	S20	+++	14.00
S7	++	12.80	S21	++	13.03
S8	++	12.65	S22	—	11.33
S9	++	12.75	S23	+	12.07
S10	++	12.95	S24	+	12.02
S11	+	12.00	S25	—	11.17
S12	+	12.00	S26	—	11.11
S13	—	11.35	S27	—	11.00
S14	—	11.20			

+++表示深粉红，++表示粉红，+表示浅粉红，—表示未分泌。  
+++ mean deep pink, ++ mean pink, + mean light pink, — meanno secretion.

表 4 根际溶磷菌的菌落的形态特征

Table 4 The morphological characteristics of the phosphorus solution of rhizosphere strains

菌株编号	大小	形态	干湿	高度	透明度	颜色	边缘	色素
Strains code	Size	Shape	Dry-wet	Height	Transparency	Color	Edge	Pigment
S1	大	圆形	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S2	大	不规则	半湿润	扁平	透明	淡黄色	锯齿	无
S3	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S4	大	不规则	半湿润	扁平	透明	淡黄色	锯齿	无
S5	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S6	大	不规则	半湿润	扁平	透明	淡黄色	锯齿	无
S7	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S8	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S9	大	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S10	大	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S11	中	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S12	中	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S13	中	不规则	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S14	中	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S15	中	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S16	中	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S17	中	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S18	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S19	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S20	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S21	大	圆形	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S22	大	不规则	半湿润	扁平	透明	淡黄色	锯齿	无
S23	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	乳白色	整齐	无
S24	大	不规则	半湿润	扁平	透明	淡黄色	锯齿	无
S25	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无
S26	大	不规则	半湿润	扁平	透明	淡黄色	锯齿	无
S27	大	不规则	半湿润	扁平	不透明	淡黄色	锯齿	无