

网络出版时间:2023-06-05 10:37 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2023.12.012  
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms2/detail/61.1390.s.20230602.1005.008.html

# 玉米根际解磷解钾细菌的筛选、鉴定及其生态适应性研究

孙亚钦<sup>1</sup>, 张书红<sup>2</sup>, 张影<sup>1</sup>, 刘星<sup>1</sup>, 吴大付<sup>1</sup>, 刘永卓<sup>1</sup>, 王菲<sup>1</sup>

(1 河南科技学院 资源与环境学院, 河南省生物药肥研发与协同应用工程研究中心, 河南 新乡 453003;

2 河南心连心化学工业集团股份有限公司, 河南 新乡 453014)

**摘要** 【目的】对玉米根际解磷和解钾细菌进行筛选、鉴定, 并分析其生态适应性, 以为丰富解磷和解钾微生物资源库以及微生物菌肥的开发利用提供优良菌株。【方法】利用平板稀释法从玉米根际筛选具有解有机磷和解无机磷能力的细菌, 通过 16S rRNA 基因序列构建系统进化树, 鉴定其种类, 随后挑选解有机磷和无机磷能力最强的菌株, 分析其解钾能力和生态适应性。【结果】在玉米根际筛选获得 9 株解有机磷细菌和 2 株解无机磷细菌, 其对应培养液中速效磷质量浓度分别为 0.018~4.479 和 5.383~6.242 mg/L。由系统进化树可知, 这些菌株分别隶属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、勒克氏菌属(*Leclercia*)和肠杆菌属(*Enterobacter*), 解有机磷最强的菌株 P4-5 与弗雷德里克斯堡假单胞菌(*P. frederiksbergensis*)聚为一支, 解无机磷最强的菌株 CP4-12 与非脱羧勒克菌(*L. adecarboxylata*)聚为一支。菌株 P4-5 和 CP4-12 从含钾长石培养液中分解出的速效钾质量浓度分别为 8.100 和 1.333 mg/L。菌株 P4-5 耐盐性强, 不耐强酸、强碱以及中度以上干旱和高浓度农药; 而菌株 CP4-12 耐盐性、耐旱性及耐药性均较强, 但不耐强酸和强碱。【结论】从玉米根际土壤中筛选出了 2 株兼具解磷和解钾能力的细菌, 均具有耐酸碱、耐盐、耐干旱和耐农药能力, 为微生物菌肥的研制提供了优良的菌种资源。

【关键词】玉米根际; 解磷解钾细菌; 生态适应性; 微生物菌肥

【中图分类号】S154.38<sup>+</sup>1

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2023)12-0111-09

## Isolation, identification and ecological adaptability of phosphate- and potassium-solubilizing bacteria in maize rhizosphere

SUN Yaqin<sup>1</sup>, ZHANG Shuhong<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, LIU Xing<sup>1</sup>,

WU Dafu<sup>1</sup>, LIU Yongzhuo<sup>1</sup>, WANG Fei<sup>1</sup>

(1 School of Resource and Environmental Sciences, Henan Institute of Science and Technology, Henan Engineering Research Center of Biological Pesticide & Fertilizer Development and Synergistic Application, Xinxiang, Henan 453003, China;

2 Henan Xinlianxin Chemicals Group Co., Ltd., Xinxiang, Henan 453014, China)

**Abstract:** 【Objective】The phosphate- and potassium-solubilizing bacteria were isolated and identified from maize rhizosphere and their ecological adaptability was further analyzed in the present study, which provide excellent strains for enriching the microbial resources library and developing microbial fertilizers. 【Method】The phosphate-solubilizing bacteria were isolated from maize rhizosphere by plate dilution meth-

【收稿日期】2022-08-11

【基金项目】国家自然科学基金面上项目(31872184); 河南省自然科学基金优秀青年科学基金项目(222300420044)

【作者简介】孙亚钦(1999-), 男, 河南滑县人, 在读硕士, 主要从事植物-解磷细菌互作研究。

E-mail: yaqinsun0622@stu.hist.edu.cn

【通信作者】刘永卓(1984-), 女, 河北石家庄人, 讲师, 博士, 主要从事土壤微生物功能多样性研究。

E-mail: liuyongzhuo1984@163.com

王菲(1982-), 女, 河南安阳人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事根际/菌丝际微生物互作增强土壤有机磷活化研究。E-mail: wangfei@hist.edu.cn

od and identified by 16S rRNA gene sequence and homologous alignment. Subsequently, the strains with the strongest capability of phosphate solubilization were selected to analyze their potassium solubilization capability and ecological adaptability. 【Result】 A total of 9 strains of organic phosphate-solubilizing bacteria and 2 strains of inorganic phosphate-solubilizing bacteria were obtained from maize rhizosphere, and the concentrations of available phosphate were 0.018 to 4.479 mg/L and 5.383 to 6.242 mg/L, respectively. According to the phylogenetic tree, these strains were identified and affiliated to *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Cupriavidus*, *Leclercia* and *Enterobacter*, respectively. The strain P4-5 with the strongest capability of organic phosphate solubilization was grouped into a clade with *Pseudomonas frederiksbergensis*, and strain CP4-12 with the strongest inorganic phosphate solubilization capacity was clustered a clade with *Leclercia adecarboxylata*. Strains P4-5 and CP4-12 dissolved potassium feldspar in the liquid medium and the corresponding available potassium concentrations were 8.100 mg/L and 1.333 mg/L, respectively. Strain P4-5 had a strong ability to resist salt, but could not tolerate strong acid and alkali, moderate drought and high concentrations of pesticides. Strain CP4-12 had strong salt, drought and pesticides resistance, while could not tolerate strong acid and alkali. 【Conclusion】 Two bacterial strains with phosphate and potassium solubilization capacity were isolated from maize rhizosphere with ability to resist acid, alkali, salt, drought and pesticides. This study provides excellent strain resources for the application of microbial fertilizers.

**Key words:** maize rhizosphere; phosphate-and potassium-solubilizing bacteria; ecological adaptability; microbial fertilizer

磷和钾是植物必需的大量营养元素,对植物的生长发育和新陈代谢发挥着不可替代的作用<sup>[1]</sup>。而土壤中可被植物根系直接吸收利用的可溶性磷和钾含量普遍较低,这成为限制作物增产的主要因素之一<sup>[2-3]</sup>。在农业生产中,为了摆脱养分限制,化学磷肥和钾肥常被大量施用,然而由于其在土壤中的存在形态和转化等特性的影响,使得更多的无效养分累积于土壤中,对土壤和植物健康以及生态环境造成了巨大的威胁<sup>[4]</sup>。因此,如何高效转化和利用土壤中的磷和钾以及提高其利用率是国内外众多学者关注的热点之一,也是实现绿色农业可持续发展的关键之一。

微生物是土壤生物区系中最重要的功能组分,直接参与着植物获取养分和土壤养分循环两个过程<sup>[5-7]</sup>。解磷和解钾细菌作为土壤微生物的重要组成部分,通过酸解、酶解、直接氧化、多糖分泌、生物膜形成等机制释放可溶性磷和钾以供植物吸收利用<sup>[8-10]</sup>。目前已被报道的解磷细菌有芽孢杆菌属、假单胞菌属、节杆菌属、肠杆菌属、沙雷氏菌属、固氮菌属等 30 多个属<sup>[11]</sup>;解钾细菌主要是隶属于芽孢杆菌属的环状芽孢杆菌、胶质芽孢杆菌和土壤芽孢杆菌<sup>[12]</sup>。而且,这些解磷和解钾细菌在改善作物生长和养分吸收方面都发挥了重要作用,如张海燕等<sup>[13]</sup>在小麦根际获得 2 株高效解磷细菌,接种后增加了小麦的根长、株高和生物量;俞海平等<sup>[14]</sup>从水

稻根际获得 1 株能够提高水稻钾营养和土壤速效钾含量的解钾细菌。随着人们在解磷、解钾细菌利用方面的不断探索,有研究发现若干细菌同时具有解磷和解钾能力,如万兵兵等<sup>[15]</sup>在烟草根际筛选得到 1 株高效解磷解钾菌株,接种该菌株后植烟区土壤有效磷、有效钾含量提高,烟草生长状况也得到了显著改善;刘晔等<sup>[16]</sup>从花生根际获得 1 株能够解磷、解钾、固氮和产吲哚乙酸(IAA)的多功能菌株,通过花生盆栽试验也证明接种该菌株显著提高了土壤速效磷、速效钾含量,促进了植株生长和养分吸收。鉴于解磷和解钾细菌在改善作物磷钾养分状况方面起着重要的作用,而目前大部分研究仅限于单一解磷或解钾菌株的分离筛选和应用,对同时具备解磷和解钾功能菌株的研究还较少,因此对多功能菌株的分离筛选和开发利用还有待进一步探索。

本试验对玉米根际解磷和解钾细菌的筛选和鉴定,对其解磷和解钾能力及生态适应性进行了研究,以期丰富解磷和解钾微生物资源库以及微生物菌肥的开发利用提供优良菌株,同时也为改善作物磷、钾营养提供技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 土样采集与处理

玉米根际土壤采自位于河南省新乡市新乡县朗公庙镇小河村的心连心肥料高效利用定位试验基地

(东经 113°50′24″,北纬 35°12′26″)。在玉米成熟期利用 5 点取样法采集根际土壤,具体操作过程如下:按照“S”形线路随机选取 5 个样点,每个样点再随机选取 3 株长势较为一致的玉米植株,将其挖出并用抖根法收集根际土壤,然后将 15 株玉米根际土壤混匀,作为一个混合样品,过孔径 2 mm 筛后根据四分法收集约 500 g 根际土壤,装入自封袋并置于冰盒中保存,带回实验室后于 4 °C 冰箱保存。

## 1.2 培养基的配制

无机磷固体培养基选用国际植物研究所磷酸盐生长培养基(NBRIP)<sup>[17]</sup>,有机磷固体培养基以 NBRIP 作为参考,个别成分和含量稍作调整,具体方法见文献[18];钾长石固体培养基配方如下:蔗糖(C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>)10 g/L,酵母膏(yeast)0.5 g/L,硫酸铵((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)1 g/L,磷酸氢二钠(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)2 g/L,硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)0.5 g/L,碳酸钙(CaCO<sub>3</sub>)1 g/L,钾长石粉(K<sub>2</sub>O 质量分数为 9.6%)1 g/L,琼脂粉 15 g/L,pH 7.0。以上培养基对应的液体培养基则不加琼脂粉。所有培养基在使用前均于 121 °C 下灭菌 30 min。

## 1.3 解磷细菌的分离、纯化和鉴定

将玉米根际土壤按照 10 倍稀释梯度制备土壤悬液后,分别吸取土壤悬液(稀释梯度为 10<sup>-4</sup>,10<sup>-5</sup>,10<sup>-6</sup>)0.1 mL,均匀涂布于有机磷和无机磷固体培养基上,28 °C 倒置培养。挑取具有明显溶磷圈的单菌落,在有机磷和无机磷固体培养基上划线纯化,直至得到纯菌株,保存于 4 °C 冰箱备用。详细的操作步骤参考孙亚钦等<sup>[18]</sup>的方法。

利用 AxyPrep 细菌基因组 DNA 小量制备试剂盒(Axygen,USA)对菌株 DNA 进行提取。采用细菌通用引物 27F(5′-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3′)和 1492R(5′-CTACGGCTACCTTGT-TACGA-3′)进行 PCR 扩增,反应体系及反应程序参考孙亚钦等<sup>[18]</sup>的方法。将 PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,首先采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(Axygen,USA)回收,之后将纯化的 PCR 产物利用 ABI 3730XL 测序仪进行双向测序(上海派森诺生物科技股份有限公司),所得 16S rRNA 基因序列的处理、比对和分析以及系统进化树的构建等步骤参考孙亚钦等<sup>[18]</sup>的方法进行。

## 1.4 菌株解磷能力分析

将菌株点接于有机磷和无机磷固体培养基中,28 °C 倒置培养 3 d 后测量溶磷圈直径(*D*)和菌落直径(*d*),并计算 *D/d* 值。同时,将菌株接种于 LB 液

体培养基中,经振荡培养、离心、清洗菌体(8.5 g/L NaCl)和定容等流程后,吸取 1 mL 菌液加入有机磷和无机磷液体培养基,再经振荡培养和离心后,吸取上清液,并采用钼锑抗比色法测定速效磷质量浓度,详细的操作步骤参考孙亚钦等<sup>[18]</sup>的方法。

## 1.5 菌株解钾能力分析

从筛选获得的解有机磷和无机磷菌株中挑选解磷能力最强的菌株,并分别将其点接于钾长石固体培养基中,在 28 °C 恒温培养箱中倒置培养 3 d,观察菌株的生长状况及透明圈的产生情况,并根据溶钾圈直径(*D*)和菌落直径(*d*)的比值(*D/d*)初步判断各菌株的解钾能力。同时,再将解有机磷和无机磷能力最强的菌株分别接种于 LB 液体培养基中,振荡培养 24 h 后(28 °C、180 r/min),在波长 600 nm 下测定菌液的吸光度(OD<sub>600</sub>),并将其调至 0.6,随后离心(5 000 r/min、3 min),弃上清液后,用生理盐水(8.5 g/L NaCl)清洗菌体 3 次,再用生理盐水定容至 15 mL,充分摇匀后吸取 1 mL 菌悬液转移到钾长石液体培养基中,以不接种菌液的处理为对照,每个菌株重复 3 次,振荡(28 °C、180 r/min)培养 12 h 后离心(12 000 r/min、2 min),吸取 10 mL 上清液,用火焰光度计测定速效钾质量浓度。

## 1.6 解磷解钾细菌的生态适应性分析

1.6.1 接种液的制备 吸取 100 μL 解磷解钾细菌的菌液至 LB 液体培养基中,振荡(28 °C、180 r/min)培养 24 h,然后测定菌液的 OD<sub>600</sub> 值,并将其调至 0.6,作为接种液。

1.6.2 菌株耐酸碱碱性测定 用 HCl 和 NaOH 制备 pH 分别为 3.0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0,9.0,10.0,11.0 和 12.0 的 LB 液体培养基,吸取 100 μL 接种液,移入不同 pH 的 LB 液体培养基中,各处理均重复 3 次。在 28 °C、180 r/min 的振荡箱中培养 1 d 后,测定其 OD<sub>600</sub> 值,检测菌株在不同 pH 环境中的生长状况。

1.6.3 菌株耐盐性测定 在 LB 液体培养基中加入不同浓度 NaCl,使其终浓度分别为 0.17,0.34,0.51,0.68,0.85,1.03,1.20 和 1.37 mol/L。吸取 100 μL 接种液,分别移入含不同浓度 NaCl 的 LB 液体培养基中,各处理均重复 3 次。在 28 °C、180 r/min 的振荡箱中培养 1 d 后,测定其 OD<sub>600</sub> 值,检测不同浓度 NaCl 处理下供试菌株的生长状况。

1.6.4 菌株耐旱性测定 利用聚乙二醇-6000(Polyethylene glycol-6000,PEG-6000)溶液模拟干旱胁迫,共设置正常供水、轻度干旱、中度干旱和重度干旱 4 个处理,对应的 PEG-6000 含量分别为 0%,



10%, 20% 和 30%。吸取 100  $\mu\text{L}$  接种液到含不同含量 PEG-6000 的 LB 液体培养基中, 各处理均重复 3 次。在 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 的振荡箱中培养 1 d 后, 测其  $\text{OD}_{600}$  值, 检测菌株在不同程度干旱条件下的生长状况。

1.6.5 菌株耐药性测定 选取常用杀菌剂多菌灵(有效成分 50%), 根据说明书中最低和最高使用含量, 将多菌灵含量设置 0.05%, 0.1%, 0.2% 和 0.5% 4 个梯度。吸取 100  $\mu\text{L}$  接种液到含不同含量多菌灵的 LB 液体培养基中, 每个处理均重复 3 次, 于 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养 1 d 后, 测其  $\text{OD}_{600}$  值, 检测不同多菌灵含量下供试菌株的生长情况。

## 1.7 数据处理与分析

数据均用“平均值 $\pm$ 标准误差”表示。使用 Mi-

crosoft Excel 2019 软件进行数据的整理和计算, 使用 SPSS 26.0 软件对数据进行单因素方差分析和  $t$  检验, 不同处理间的差异通过新复极差法(Duncan's) 进行比较( $P < 0.05$ ), 最后用 Microsoft Excel 2019 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米根际土壤中不同菌株的解磷能力分析

经过筛选共得到 9 株具有解有机磷能力的细菌, 将其分别命名为 P4-5、P4-9、P4-11、P4-12、P4-13、P4-19、P4-22、P4-35 和 P4-46; 另还得到 2 株具有解无机磷能力的细菌, 将其分别命名为 CP4-12 和 CP4-23(图 1)。以上 9 株细菌的解磷能力见表 1。

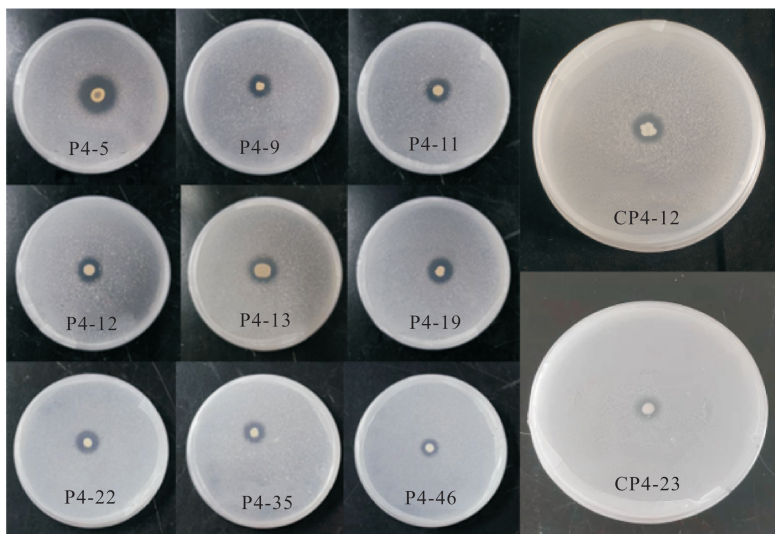


图 1 玉米根际土壤中不同菌株产生的溶磷圈

Fig. 1 Phosphate-solubilization halo produced by different strains from maize rhizosphere

表 1 玉米根际土壤中不同菌株的溶磷圈直径( $D$ )、菌落直径( $d$ )、 $D/d$  值和速效磷质量浓度

Table 1 Diameters of halo and colony,  $D/d$  ratio and available P concentration of different strains from maize rhizosphere

菌株编号 Number of strains	磷源 Phosphorus source	溶磷圈直径( $D$ )/cm Diameter of halo	菌落直径( $d$ )/cm Diameter of colony	$D/d$ 值 $D/d$ value	速效磷/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Available P concentration
P4-5	植酸钙 Phytin	$2.1 \pm 0.05$ a	$0.8 \pm 0.05$ a	$2.6 \pm 0.10$ a	$4.479 \pm 0.274$ a
P4-9	植酸钙 Phytin	$1.2 \pm 0.05$ ef	$0.6 \pm 0.02$ b	$2.2 \pm 0.01$ bcd	$0.245 \pm 0.008$ b
P4-11	植酸钙 Phytin	$1.3 \pm 0.00$ cde	$0.7 \pm 0.02$ b	$2.0 \pm 0.07$ cde	$0.079 \pm 0.024$ b
P4-12	植酸钙 Phytin	$1.3 \pm 0.02$ de	$0.7 \pm 0.02$ b	$1.9 \pm 0.03$ def	$0.018 \pm 0.001$ b
P4-13	植酸钙 Phytin	$1.5 \pm 0.03$ b	$0.9 \pm 0.05$ a	$1.6 \pm 0.06$ fg	$0.025 \pm 0.002$ b
P4-19	植酸钙 Phytin	$1.4 \pm 0.07$ bc	$0.6 \pm 0.00$ b	$2.4 \pm 0.12$ ab	$0.155 \pm 0.008$ b
P4-22	植酸钙 Phytin	$1.4 \pm 0.03$ bcd	$0.6 \pm 0.00$ b	$2.3 \pm 0.05$ bc	$0.050 \pm 0.032$ b
P4-35	植酸钙 Phytin	$1.1 \pm 0.00$ f	$0.6 \pm 0.03$ b	$1.7 \pm 0.07$ efg	$0.144 \pm 0.030$ b
P4-46	植酸钙 Phytin	$0.8 \pm 0.03$ g	$0.5 \pm 0.03$ b	$1.6 \pm 0.11$ g	$0.144 \pm 0.026$ b
CP4-12	磷酸钙 Calcium phosphate	$0.7 \pm 0.01$ b	$0.5 \pm 0.01$ a	$1.3 \pm 0.05$ b	$6.242 \pm 0.096$ a
CP4-23	磷酸钙 Calcium phosphate	$0.9 \pm 0.00$ a	$0.5 \pm 0.00$ b	$1.9 \pm 0.00$ a	$5.383 \pm 0.170$ b

注: 同列数据后标不同小写字母表示同一磷源下不同菌株间存在显著差异( $P < 0.05$ )。下表同。

Note: Different lowercase letters indicate significant differences among different strains for same phosphorus sources at the  $P < 0.05$  level. The same below.

由表 1 可知,根据  $D/d$  值和培养液中速效磷的质量浓度,不同菌株之间的解磷能力存在差异。在解有机磷的细菌中, $D/d$  值和速效磷质量浓度均最高的是菌株 P4-5,显著高于其他菌株(对于  $D/d$  值来说,菌株 P4-19 除外)。在解无机磷的细菌中, $D/d$  值最高的是菌株 CP4-23,显著高于菌株 CP4-12,而其培养液中速效磷质量浓度却显著低于 CP4-12。

由于平板“溶磷圈”法并不能作为评判微生物是否具有溶磷能力的绝对标准方法,测定培养液中速效磷质量浓度才是准确判定其溶磷能力的可靠方法<sup>[19]</sup>。因此,从表 1 可以判定菌株 P4-5 具有较强的降解植酸钙的能力,菌株 CP4-12 具有较强的溶解磷酸钙的能力。

### 2.2 玉米根际土壤中不同菌株的分子生物学鉴定

由系统进化树(图 2)可知,解有机磷菌株 P4-5

属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),与弗雷德里克斯堡假单胞菌(*Pseudomonas frederiksbergensis*)聚为一支;菌株 P4-9、P4-11、P4-12、P4-13、P4-19、P4-22 和 P4-35 同属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),其中菌株 P4-9、P4-11、P4-12 和 P4-22 与巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)聚为一支,菌株 P4-13、P4-19 和 P4-35 与阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatai*)聚为一支;菌株 P4-46 属于贪铜菌属(*Cupriavidus*),与草酸盐贪铜菌(*Cupriavidus oxalaticus*)聚为一支;解无机磷菌株 CP4-12 属于勒克氏菌属(*Leclercia*),菌株 CP4-23 属于肠杆菌属(*Enterobacter*),分别与非脱羧勒克菌(*Leclercia adecarboxylata*)和 *Enterobacter bugandensis* 聚为一支。将所有菌株的 16S rRNA 基因序列上传至 NCBI 后,得到的序列号见表 2。

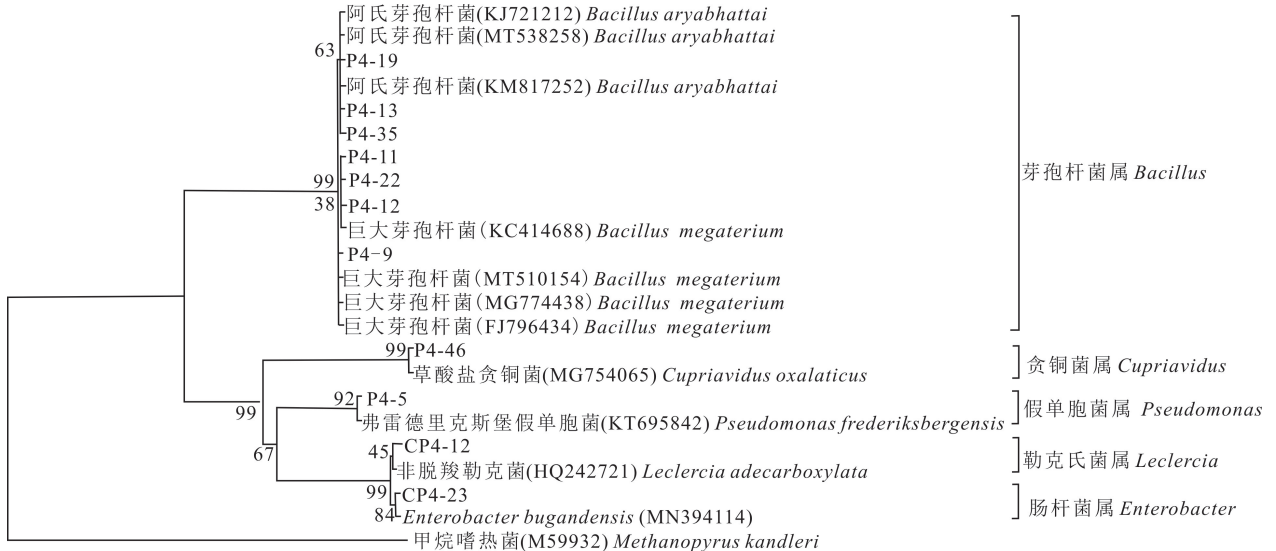


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的不同菌株的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of different strains based on 16S rRNA gene sequences

表 2 玉米根际土壤中不同菌株的 NCBI 序列号

Table 2 Accession number of different strains isolated from maize rhizosphere in NCBI database

菌株编号 Number of strains	菌株名称 Name of strains	序列号 Accession number	菌株编号 Number of strains	菌株名称 Name of strains	序列号 Accession number
P4-5	弗雷德里克斯堡假单胞菌 <i>Pseudomonas frederiksbergensis</i>	OP035941	P4-22	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	OP035947
P4-9	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	OP035942	P4-35	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	OP035948
P4-11	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	OP035943	P4-46	草酸盐贪铜菌 <i>Cupriavidus oxalaticus</i>	OP035949
P4-12	巨大芽孢杆菌 <i>Bacillus megaterium</i>	OP035944	CP4-12	非脱羧勒克菌 <i>Leclercia adecarboxylata</i>	OP035950
P4-13	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	OP035945	CP4-23	<i>Enterobacter bugandensis</i>	OP035951
P4-19	阿氏芽孢杆菌 <i>Bacillus aryabhatai</i>	OP035946			

### 2.3 玉米根际土壤中菌株的解钾能力分析

根据表 1 的结果,选取解有机磷和解无机磷能力相对较强的菌株 P4-5 和 CP4-12 进行解钾能力的分析。从图 3 和表 3 可以看出,菌株 P4-5 和 CP4-

12 均具有解钾的能力,两者  $D/d$  值的差异不显著。而对于培养液中速效钾质量浓度来讲,菌株 P4-5 和 CP4-12 均具有溶解钾长石粉并释放钾离子的能力,且菌株 P4-5 的解钾能力显著高于 CP4-12。

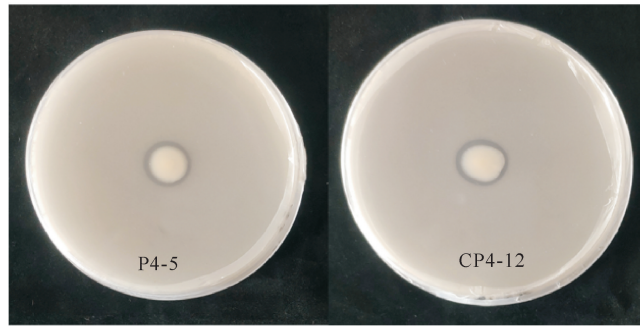


图 3 玉米根际土壤中解钾菌株产生的透明圈

Fig. 3 Transparent halo produced by potassium-solubilizing strains from maize rhizosphere

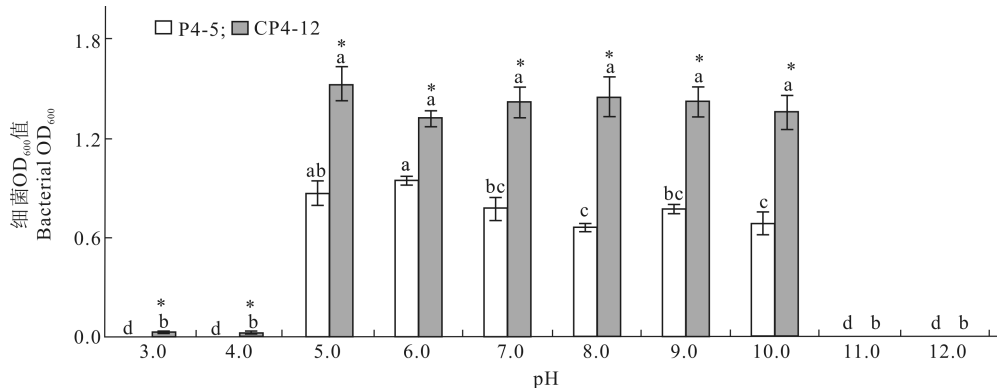
表 3 玉米根际土壤中不同菌株的解钾圈直径( $D$ )、菌落直径( $d$ )、 $D/d$  值和速效钾质量浓度Table 3 Diameters of halo and colony,  $D/d$  ratio and available K concentration of different strains from maize rhizosphere

菌株编号 Number of strains	解钾圈直径( $D$ )/cm Diameter of halo	菌落直径( $d$ )/cm Diameter of colony	$D/d$ 值 $D/d$ value	速效钾/( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Available K concentration
P4-5	$1.5 \pm 0.03$ a	$1.2 \pm 0.07$ a	$1.2 \pm 0.01$ a	$8.100 \pm 0.759$ a
CP4-12	$1.5 \pm 0.19$ a	$1.3 \pm 0.02$ a	$1.2 \pm 0.01$ a	$1.333 \pm 0.109$ b

## 2.4 玉米根际土壤中解磷解钾菌株的生态适应性

2.4.1 耐酸碱性 不同 pH 下玉米根际土壤中解磷解钾菌株的生长状况见图 4。如图 4 所示,菌株

P4-5 在极酸( $\text{pH}=3.0 \sim 4.0$ )和极碱( $\text{pH}=11.0 \sim 12.0$ )条件下无法生长,但在 pH 为  $5.0 \sim 10.0$  的培养基上生长良好,其中在 pH 为  $6.0$  时生长最旺盛。



图柱上标不同小写字母代表同一菌株不同处理间的差异达到显著水平( $P < 0.05$ ),

\* 代表在同一 pH 下不同菌株间的差异达到显著水平( $P < 0.05$ )。下图同

Different lowercase letters represent significant differences among different treatments for same strains ( $P < 0.05$ ), and \* represents significant differences between different strains for same pH treatments ( $P < 0.05$ ). The same below

图 4 不同 pH 下玉米根际土壤中解磷解钾菌株的生长状况

Fig. 4 Growth status of phosphate- and potassium-solubilizing strains from maize rhizosphere under different pH conditions

菌株 CP4-12 在碱性极强( $\text{pH}=11.0 \sim 12.0$ )的培养基上完全不能生长,在强酸( $\text{pH}=3.0 \sim 4.0$ )条件下几乎无法生长,在 pH 分别为  $5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0$  的培养基中生长状况良好,但差异均未到达显著水平。此外,在 pH 为  $5.0 \sim 10.0$  的条件下菌株 CP4-12 的生长状况显著优于菌株 P4-5 (图 4)。

2.4.2 耐盐性 如图 5 所示,当 NaCl 浓度为  $0.17 \sim 1.20$  mol/L 时,菌株 P4-5 表现出较好的耐

盐性,生长状况良好;当 NaCl 浓度达到  $1.37$  mol/L 时,菌株 P4-5 生长受到一定程度的抑制。当 NaCl 浓度为  $0.17 \sim 0.85$  mol/L 时,菌株 CP4-12 的生长状况良好;但当 NaCl 浓度高于  $1.03$  mol/L 时,菌株 CP4-12 的生长受到显著抑制。此外,当 NaCl 浓度为  $0.17 \sim 1.20$  mol/L 时,菌株 CP4-12 的生长状况显著优于菌株 P4-5;而当 NaCl 浓度为  $1.37$  mol/L 时,菌株 CP4-12 的生长状况反而显著低于菌株 P4-5。

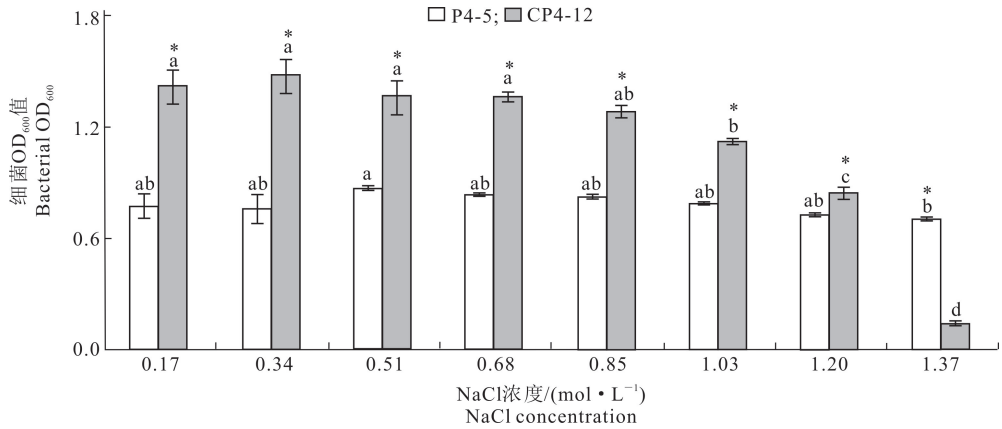


图 5 不同 NaCl 浓度下玉米根际土壤中解磷解钾菌株的生长状况

Fig. 5 Growth status of phosphate- and potassium-solubilizing strains from maize rhizosphere under different NaCl concentrations

2.4.3 耐旱性 如图 6 所示,菌株 P4-5 在 PEG 含量为 0~10% 时均能生长良好,但当 PEG 含量分别为 20% 和 30% 时菌株 P4-5 则完全无法生长。当 PEG 含量为 0~30% 时,菌株 CP4-12 均能生长,但随着 PEG 含量的增加,其生长明显受到抑制。当 PEG 含量相同时,菌株 CP4-12 较菌株 P4-5 表现出了更好的耐旱性。

2.4.4 耐药性 如图 7 所示,菌株 P4-5 在多菌灵

含量为 0.5% 的条件下完全无法生长,但能够在多菌灵含量为 0.05%~0.2% 的培养基中生长,且随着多菌灵含量的减少其生长越旺盛。菌株 CP4-12 能够在多菌灵含量为 0.05%~0.5% 的培养基中生存,随着多菌灵含量的减少,其生长状况更优。在同一多菌灵含量下,菌株 CP4-12 比菌株 P4-5 表现出了更好的耐药性。

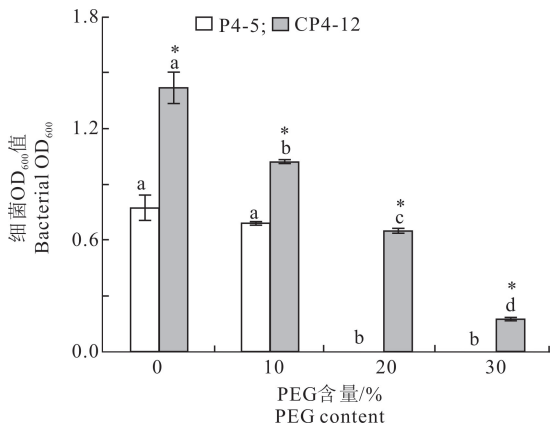


图 6 不同 PEG 含量下玉米根际土壤中解磷解钾菌株的生长状况

Fig. 6 Growth status of phosphate- and potassium-solubilizing strains from maize rhizosphere under different PEG contents

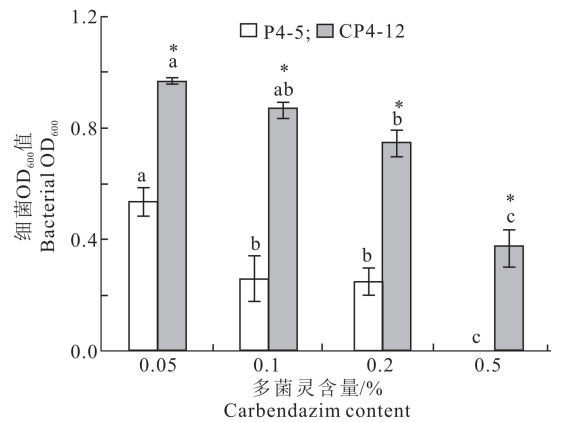


图 7 不同多菌灵含量下玉米根际土壤中解磷解钾菌株的生长状况

Fig. 7 Growth status of phosphate- and potassium-solubilizing strains from maize rhizosphere under different carbendazim contents

### 3 讨论

近年来,在化肥和农药减施、农业绿色发展和生态环境保护等背景下,作为环保型修复剂的微生物菌肥受到了越来越多的关注,在农业生产中的广泛应用也取得较为显著的效果<sup>[20-22]</sup>。微生物菌肥的主要成分是功能微生物,其数量、活性、抗性特征直

接影响微生物菌肥的品质和施用效果<sup>[23]</sup>。因此,高效功能微生物的筛选和理化特性分析对植物养分吸收以及菌肥的研制具有重要意义。

本研究通过平板稀释法从玉米根际筛选得到解有机磷细菌 9 株和解无机磷细菌 2 株,结合溶磷圈法和培养液法在解有机磷和解无机磷细菌中分别挑选出解磷能力最强的菌株 P4-5 和 CP4-12。为进一



步验证菌株 P4-5 和 CP4-12 是否也具有解钾能力,用溶钾圈法和培养液法对菌株 P4-5 和 CP4-12 的解钾能力进行了分析,结果发现,这 2 种菌株在含钾长石粉的平板上能够形成透明圈,也可以从其培养液中检测到速效钾,即说明这 2 种菌株具有分解钾长石而释放钾离子的能力。由此可以判定,菌株 P4-5 和 CP4-12 同时具有解磷和解钾的能力。当菌株 P4-5 和 CP4-12 培养 12 h 后培养液中的速效磷质量浓度分别为 4.479 和 6.242 mg/L,速效钾质量浓度分别为 8.100 和 1.333 mg/L。燕红等<sup>[24]</sup>从农田土壤中筛选出兼具溶磷和解钾能力的菌株 K-1-1,将其培养一定时间后,培养液中的速效磷和速效钾质量浓度分别可达 6.81 和 81 mg/L,溶磷溶钾能力明显优于菌株 P4-5 和 CP4-12。以上研究结果的差异可能与培养时间、培养基成分、磷源或钾源的含量等条件不同有关。本研究经过 16S rRNA 基因测序以及同源序列比对,鉴定出菌株 P4-5 隶属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),CP4-12 隶属于勒克氏菌属(*Leclercia*)。麻瑞阳等<sup>[25]</sup>从内蒙包头向日葵地土壤中筛选获得 1 株既能溶解无机磷和有机磷,又能分解钾长石的菌株 NX-11,而且鉴定 NX-11 菌株为枯草芽孢杆菌枯草亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *Subtilis*)。有研究证明,假单胞菌属(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)细菌是生产实践中应用效果较显著的商用微生物菌肥的主要菌种<sup>[22,26-28]</sup>。

作为微生物菌肥的有效成分,高效功能菌株在生产中抵抗非生物胁迫(例如气候、土壤酸碱性和、耐药性等)能力的强弱直接影响菌肥效果的发挥<sup>[29-32]</sup>。本研究对解磷解钾菌株 P4-5 和 CP4-12 耐酸碱性、耐旱性、耐盐性和耐药性的分析发现,菌株 P4-5 耐盐性强,不耐强酸、强碱以及中度以上干旱和高浓度农药;而菌株 CP4-12 的耐盐性、耐旱性及耐药性均较强,但不耐强酸和强碱,说明这 2 株菌对盐均有很强的耐性,对酸碱、干旱和农药也有一定的耐性,综合比较可知菌株 CP4-12 的适应性更强,这为其在农业生产中的应用提供了保障。

本研究从玉米根际筛选得到 2 株解磷解钾菌株,其对酸碱、盐、干旱、农药具有一定的耐受性,这不仅丰富了菌种资源库,也为微生物菌肥的研制和应用提供了理论依据和数据支撑。虽然这 2 株菌基本具备发展为微生物菌肥的潜力,但还需通过盆栽或田间试验来验证其促生效果及稳定性,这是本研究下一步的重点。

## 4 结 论

本研究从玉米根际土壤中筛选获得了解有机磷和解无机磷能力最强的菌株 P4-5 和 CP4-12,分别隶属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)和勒克氏菌属(*Leclercia*),而且这 2 种菌株均具有一定的解钾、耐酸碱、耐盐、耐干旱、耐农药的能力,这为研制高效优质的微生物肥料提供了优良的候选菌株。

### [参考文献]

- [1] Wang Y, Chen Y F, Wu W H. Potassium and phosphorus transport and signaling in plants [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(1): 34-52.
- [2] Yuan Z W, Jiang S Y, Sheng H, et al. Human perturbation of the global phosphorus cycle: changes and consequences [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5): 2438-2450.
- [3] Sattar A, Naveed M, Ali M, et al. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: a review [J]. *Applied Soil Ecology*, 2019, 133: 146-159.
- [4] Jupp A R, Beijer S, Narain G C, et al. Phosphorus recovery and recycling-closing the loop [J]. *Chemical Society Reviews*, 2021, 50(1): 87-101.
- [5] 朱永官, 彭静, 韦中, 等. 土壤微生物组与土壤健康 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51(1): 1-11.  
Zhu Y G, Peng J J, Wei Z, et al. Linking the soil microbiome to soil health [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2021, 51(1): 1-11.
- [6] Garcia J, Kao-Kniffin J. Microbial group dynamics in plant rhizospheres and their implications on nutrient cycling [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 1516.
- [7] Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini M T, et al. Microbial diversity and soil functions [J]. *European Journal of Soil Science*, 2017, 68(1): 12-26.
- [8] Tian J, Ge F, Zhang D Y, et al. Roles of phosphate solubilizing microorganisms from managing soil phosphorus deficiency to mediating biogeochemical P cycle [J]. *Biology*, 2021, 10(2): 158.
- [9] Etesami H, Emami S, Alikhani H A. Potassium solubilizing bacteria (KSB): mechanisms, promotion of plant growth, and future prospects: a review [J]. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 2017, 17(4): 897-911.
- [10] 韩苗, 朱晓艳, 陈国炜, 等. 解钾菌及其释钾微观机制的研究进展 [J]. *土壤学报*, 2022, 59(2): 334-348.  
Han M, Zhu X Y, Chen G W, et al. Advances on potassium-solubilizing bacteria and their microscopic potassium solubilizing mechanisms [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2022, 59(2): 334-348.
- [11] 张艺灿, 刘凤之, 王海波. 根际溶磷微生物促生机制研究进展 [J]. *中国土壤与肥料*, 2020(2): 1-9.  
Zhang Y C, Liu F Z, Wang H B. Research progress on plant-



- growth-promoting mechanisms of phosphate-solubilizing rhizosphere microbes [J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2020(2):1-9.
- [12] 张爱民,李乃康,赵钢勇,等. 土壤中解磷、解钾微生物研究进展 [J]. *河北大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(4):442-448.  
Zhang A M, Li N K, Zhao G Y, et al. Research progress on the phosphate-solubilizing and potassium-solubilizing microorganisms [J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2015, 35(4):442-448.
- [13] 张海燕,唐梦园,白美玉,等. 小麦根际解磷细菌的筛选鉴定及培养条件的研究 [J]. *河南大学学报(自然科学版)*, 2020, 50(4):425-432.  
Zhang H Y, Tang M Y, Bai M Y, et al. Study on screening, identification and culture conditions of phosphorus-solubilizing bacteria in wheat rhizosphere [J]. *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2020, 50(4):425-432.
- [14] 俞海平,傅庆林,刘俊丽,等. 解磷细菌的分离筛选及其对水稻的促生效果 [J]. *浙江农业科学*, 2022, 63(6):1161-1164.  
Yu H P, Fu Q L, Liu J L, et al. Isolation and identification of decomposing potassium bacteria and its promoting effect on rice [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2022, 63(6):1161-1164.
- [15] 万兵兵,刘 晔,吴 越,等. 烟草根际解磷解钾菌的筛选鉴定及应用效果研究 [J]. *河南农业科学*, 2016, 45(9):46-51.  
Wan B B, Liu Y, Wu Y, et al. Screening, identification of phosphate-and potassium-solubilizing PGPR and its promoting effect on tobacco [J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2016, 45(9):46-51.
- [16] 刘 晔,刘晓丹,张林利,等. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究 [J]. *生物技术通报*, 2017, 33(10):125-134.  
Liu Y, Liu X D, Zhang L L, et al. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.) [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10):125-134.
- [17] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(1):265-270.
- [18] 孙亚钦,叶盛嘉,范国安,等. 麦田土壤解磷细菌的筛选及其解磷能力研究 [J]. *西北农业学报*, 2022, 31(3):379-387.  
Sun Y Q, Ye S J, Fan G A, et al. Isolation and phosphate-solubilizing capability of phosphate-solubilizing bacteria in a wheat field [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2022, 31(3):379-387.
- [19] 叶劲松,卫新来,郭梦瑶,等. 一株不产“透明圈”解磷菌的初筛及其溶磷能力的初步测定 [J]. *安徽农学通报*, 2016, 22(23):38-39.  
Ye J S, Wei X L, Guo M Y, et al. Preliminary isolation of a phosphate-solubilizing bacterium without ‘clear halo’ production and determination of phosphate solubilization capability [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2016, 22(23):38-39.
- [20] 李可可,陈 腊,米国华,等. 微生物肥料在玉米上的应用研究进展 [J]. *玉米科学*, 2021, 29(3):111-122.  
Li K K, Chen L, Mi G H, et al. Research progress on the microbial fertilizer application in maize [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2021, 29(3):111-122.
- [21] Mahanty T, Bhattacharjee S, Goswami M, et al. Biofertilizers: a potential approach for sustainable agriculture development [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(4):3315-3335.
- [22] Nosheen S, Ajmal I, Song Y D. Microbes as biofertilizers, a potential approach for sustainable crop production [J]. *Sustainability*, 2021, 13(4):1868.
- [23] Basu A, Prasad P, Das S N, et al. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects [J]. *Sustainability*, 2021, 13(3):1140.
- [24] 燕 红,于彩莲,包 鑫,等. 高效解磷兼解钾活性菌株分离筛选的初步研究 [J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2016, 37(1):81-90.  
Yan H, Yu C L, Bao X, et al. Preliminary study on isolation and screening of highly-effective strain in decomposing phosphate and potassium [J]. *Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition)*, 2016, 37(1):81-90.
- [25] 麻瑞阳,张爱民,惠小双,等. 高效解磷解钾菌 NX-11 菌株的分离筛选、鉴定及最佳培养条件的确定 [J]. *华北农学报*, 2013, 28(2):202-208.  
Ma R Y, Zhang A M, Hui X S, et al. Screening, identification and sporulation conditions optimization of NX-11 strain having the ability of solubilizing phosphorus and potassium [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(2):202-208.
- [26] 张 娜,朱 艳,肖 娟,等. 沼泽红假单胞菌与枯草芽孢杆菌混施对水稻根域细菌多样性与功能的影响 [J]. *植物营养与肥料学报*, 2022, 28(1):58-71.  
Zhang N, Zhu Y, Xiao X, et al. Effects of co-inoculation of *Rhodopseudomonas palustris* and *Bacillus subtilis* on the diversity and function of soil bacteria in rice root zone [J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2022, 28(1):58-71.
- [27] 吴红森,张晟恺,焦艳阳,等. 微生物菌肥对太子参连作障碍和药理作用的改良效应 [J]. *中国生态农业学报*, 2021, 29(8):1315-1326.  
Wu H M, Zhang S K, Jiao Y Y, et al. Effects of microbial fertilizer application on the quality and pharmacological activities of *Radix pseudostellariae* under continuous monoculture regimes [J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2021, 29(8):1315-1326.
- [28] Jiménez J A, Novinscak A, Filion M. *Pseudomonas fluorescens* LBUM677 differentially increases plant biomass, total oil content and lipid composition in three oilseed crops [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4):1119-1127.

- [J]. 工程科学与技术, 2019, 51(5): 137-142.
- Luo M, Ding R, Huang E, et al. Study on stage-discharge relationship curve in mountain rivers [J]. *Advanced Engineering Sciences*, 2019, 51(5): 137-142.
- [16] 王庆国, 李嘉, 李克锋, 等. 减水河段水力生态修复措施的改变效果分析 [J]. *水利学报*, 2009, 40(6): 756-761.
- Wang Q G, Li J, Li K F, et al. Effectiveness of hydraulic ecological rehabilitation measures in flow reduced river reaches [J]. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2009, 40(6): 756-761.
- [17] 徐立中, 张振, 严锡君, 等. 非接触式明渠水流监测技术的发展现状 [J]. *水利信息化*, 2013(3): 37-44, 50.
- Xu L Z, Zhang Z, Yan X J, et al. Advances of non-contact instruments and techniques for open-channel flow measurements [J]. *Water Resources Informatization*, 2013(3): 37-44, 50.
- [18] 张振, 徐枫, 王鑫, 等. 河流水面成像测速研究进展 [J]. *仪器仪表学报*, 2015, 36(7): 1441-1450.
- Zhang Z, Xu F, Wang X, et al. Research progress on river surface imaging velocimetry [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2015, 36(7): 1441-1450.
- [19] 吴志勇, 徐梁, 唐运忆, 等. 水文站流量在线监测方法研究进展 [J]. *水资源保护*, 2020, 36(4): 1-7.
- Wu Z Y, Xu L, Tang Y Y, et al. Research progress of on-line discharge monitoring methods in hydrometry stations [J]. *Water Resources Protection*, 2020, 36(4): 1-7.
- [20] Wessels P, Rooseboom A. Flow-gauging structures in South African rivers: I. an overview [J]. *Water SA*, 2012, 35(1): 1-9.
- [21] 周昱瑛, 刘信华, 黄伟军. 山区河流主要特性分析及滩险整治方法初探 [J]. *水运工程*, 2005(1): 50-54.
- Zhou Y Y, Liu X H, Huang W J. Characteristics analysis of mountainous rivers and regulation method investigation of rapids [J]. *Port & Waterway Engineering*, 2005(1): 50-54.
- [22] Piton G, Recking A. Effects of check dams on bed-load transport and steep-slope stream morphodynamics [J]. *Geomorphology*, 2017, 291: 94-105.
- [23] Radspinner R R, Diplas P, Lightbody A F, et al. River training and ecological enhancement potential using in-stream structures [J]. *Journal of Hydraulic Engineering*, 2010, 136(12): 967-980.
- [24] Wessels P, Rooseboom A. Flow-gauging structures in South African rivers: II. calibration [J]. *Water SA*, 2012, 35(1): 11-19.
- [25] 王文娥, 廖伟, 陈土成, 等. 堰槽组合设施测流机制试验研究 [J]. *水科学进展*, 2021, 32(6): 922-932.
- Wang W E, Liao W, Chen T C, et al. Experimental study on the flow measurement mechanism of a weir-flume combination facility [J]. *Advances in Water Science*, 2021, 32(6): 922-932.
- [26] 吴持恭. 水力学 [M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2007: 218-219.
- Wu C G. *Hydraulics* [M]. 4th ed. Beijing: Higher Education Press, 2007: 218-219.
- [27] 王长德. 量水技术与设施 [M]. 北京: 中国水利水电出版社, 2006: 33-34.
- Wang C D. *Water measurement technique and measure* [M]. Beijing: China Water & Power Press, 2006: 33-34.

(上接第 119 页)

- [29] 陈腊, 米国华, 李可可, 等. 多功能植物根际促生菌对东北黑土区玉米的促生效果 [J]. *应用生态学报*, 2020, 31(8): 2759-2766.
- Chen L, Mi G H, Li K K, et al. Effects of multifunctional plant rhizosphere promoting bacteria on maize growth in black soil areas in Northeast China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2020, 31(8): 2759-2766.
- [30] Jansson J K, Hofmockel K S. Soil microbiomes and climate change [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(1): 35-46.
- [31] Wang C Y, Zhou X, Guo D, et al. Soil pH is the primary factor driving the distribution and function of microorganisms in farmland soils in northeastern China [J]. *Annals of Microbiology*, 2019, 69(13): 1461-1473.
- [32] Al-Enazi N M, Al-Tami M S, Alhomaidi E. Unraveling the potential of pesticide-tolerant *Pseudomonas* sp. augmenting biological and physiological attributes of *Vigna radiata* (L.) under pesticide stress [J]. *RSC Advances*, 2022, 12(28): 17765-17783.