

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2020.19091

鳗草根际溶磷微生物分离、筛选及其对鳗草生长的影响

张雪梅¹, 张秀梅^{1,2}, 李文涛¹

1. 中国海洋大学, 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266072

摘要: 为明确鳗草(*Zostera marina*)根际溶磷微生物溶磷能力及其对鳗草生长的影响, 采用选择性无磷培养基从鳗草根际土壤中分离获得 4 株具较高溶磷能力的菌株(P1、P2、P3 和 P4), 从形态学、生理生化特征及 16S rDNA 等方面对菌株进行了鉴定, 探讨了菌株的最适培养条件, 研究了其对鳗草植株存活、生长、生理及根际土壤酶活力的影响。结果表明, 菌株 P1~P4 分别为芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis* P1)、桑肠杆菌(*Enterobacter mori* P2)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* P3)和 *Cobetia marina* P4; 72 h 菌株培养液中可溶性磷含量分别为 116.98 mg/L、123.13 mg/L、130.21 mg/L 和 76.54 mg/L; 最适培养温度分别为 34.67℃、33.95℃、34.60℃和 31.19℃; 最适培养盐度分别为 27.10、28.29、29.54 和 26.08; 最适初始 pH 分别为 8.26、7.92、8.17 和 8.21。鳗草室外盆栽实验证实, 4 个接菌处理组对鳗草植株的存活、生长生理及根际土壤酶活力等指标均有不同程度的提高或改善。其中菌株 P2 对鳗草生长的影响最为显著, 单株新叶面积、地上及地下生产力最高, 为(54.31±4.79) cm²、(3.58±0.36) mg/(shoot·d)及(0.28±0.04) mg/(shoot·d), 是对照组的 2.77、2.91 和 1.75 倍; 叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素 4 种光合色素含量分别为 31.35 μg/cm²、12.57 μg/cm²、39.42 μg/cm²和 6.21 μg/cm², 显著高于对照组($P<0.05$)。除菌株 P4 处理组外, 其余各处理组的碱性磷酸酶活力均显著高于对照组($P<0.05$)。但脲酶含量与对照组无显著差异($P>0.05$)。综合分析认为, 桑肠杆菌(*Enterobacter mori* P2)具备进一步研制溶磷微生物肥料的潜力, 在海草床生态系统恢复中可能具有较高的应用价值。研究结果为深入探究高效溶磷菌株功能与代谢调控及其在鳗草植株人工促繁中的作用奠定了基础。

关键词: 鳗草; 溶磷菌; 16S rDNA; 盆栽实验; 促生作用

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2020)01-0082-14

海草是一类沉水性海洋单子叶植物, 是海洋中重要的初级生产者之一, 其构成的海草床生态系统与红树林和珊瑚礁并称为三大典型海洋生态系统, 具有重要的生态功能和经济服务价值^[1-2]。然而由于自然因素和人类活动的影响, 海草资源及生存状况面临严峻考验, 海草床资源修复和保护工作迫在眉睫^[3-4]。与经济藻类成熟的商业化苗种培育技术不同, 目前海草床退化生境修复仍依赖于天然供体, 相关研究主要集中在移植固定方法^[4-5]、移植效果影响因素^[6]等方面, 而对于如何

通过人工促繁的方式减少天然供体使用量, 提高移植植株存活率的研究较少。因此, 尽快建立与完善高效优质的人工促繁技术, 已成为当前海草床恢复研究和实践中的重大命题, 具有极高的应用价值^[6-7]。

溶磷菌是一类能够将土壤中难溶性磷转化为植物能够吸收利用的可溶性磷, 提高土壤中磷元素利用率的微生物^[8], 在陆生经济及生态物种的人工促繁中发挥重要作用。Wang 等^[9]研究证实, 黑曲霉(*Aspergillus niger*)除溶磷功能外, 能显著

收稿日期: 2019-05-05; 修订日期: 2019-06-11.

基金项目: 国家海洋公益性行业科研专项(201405010); 山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0501).

作者简介: 张雪梅(1993-), 女, 硕士研究生, 从事资源增殖生态学研究. E-mail: Zhang.XM@outlook.com

通信作者: 张秀梅, 教授. E-mail: xiumei1227@163.com

降低小麦根际病原真菌含量并促进小麦生长。赵龙飞等^[10]从大豆根瘤内分离得到 3 株具有较高抗逆性的内生溶磷菌株, 应用研究表明, 其能显著增加大豆植株株高和鲜重。Xie 等^[11]研究证实, 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida* GR12-2)不仅对磷矿粉有较好的溶解效果, 且能分泌生长素(IAA)等生长调节物质促进植物根系生长。也有研究表明, 海草床生态系统沉积物中存在大量微生物, 在海洋物质循环和能量流动中扮演重要角色^[12-13]。但关于其中溶磷微生物的研究也仅局限在溶磷微生物分离筛选等方面^[14], 将溶磷微生物应用于海草植株人工促繁的研究还未见报道。

鳎草(*Zostera marina*)属鳎草科(Zosteraceae)鳎草属, 是唯一可以适应海洋生活并开花结籽的单子叶植物, 在中国主要分布在辽宁、河北及山东等地海域浅水区^[15-16]。为探明鳎草幼苗对接溶磷微生物的生长及生理响应过程, 采用选择性 SRSM 培养基从鳎草根际分离、筛选高效溶磷菌株, 并对其培养条件进行优化, 通过人工控制条件下接种不同种类溶磷微生物, 监测植株的存活生长状况, 测定植株叶片的 4 类光合色素含量, 根际土壤脱氢酶、脲酶及碱性磷酸酶活力, 间隙水中营养盐含量等, 初步探究外源接种溶磷微生物对鳎草幼苗的促生作用。研究结果可为深入探究溶磷菌株促生功能与代谢调控及实现鳎草植株规模化人工扩繁提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

1.1.1 鳎草根际沉积物 2017 年 7 月于山东半岛东部荣成天鹅湖(36.43°N, 122.26°E)海域海草床生态系统内选取 3 个站位。低潮时用无菌铲在每个站位随机选取间距大于 20 cm 的 3 个点, 采集不超过 5 cm 深度的表层沉积物, 装入无菌袋密封保存。采集的沉积物样本迅速装入冰盒, 尽快运达实验室。

1.1.2 鳎草植株 实验用鳎草植株采自山东省荣成市天鹅湖海域(36.43°N, 122.26°E)。采集时, 将植株从底部连根挖出, 确保鳎草植株完整。植株经海水浸洗, 去除底质、贝类及其他附生生物, 移

入盛有海水的泡沫箱中, 24 h 内移送回实验室, 于室外水槽中暂养 3 d, 暂养期间采用自然海水, 平均盐度为 30.79, 每日 14 时的平均水温为 19.85℃。

1.2 培养基

选择性改良培养基 SRSM^[17]用于溶磷菌分离、纯化: 葡萄糖 10 g, 磷酸钙 5 g, 硫酸铵 0.5 g, 氯化钾 0.2 g, 七水硫酸镁 0.3 g, 硫酸锰 0.004 g, 硫酸亚铁 0.002 g, 氯化钠 20 g, 酵母提取物 0.5 g, 溴甲酚紫 0.1 g, 超纯水 1000 mL。其中磷酸钙单独灭菌。灭菌后 pH 7.2, 用 1 mol/L 氢氧化钠调节。

LB 培养基^[18]: 蛋白胨 10 g, 酵母粉 5 g, 氯化钠 25 g, 超纯水 1 L, 用于溶磷菌鉴定及扩繁。固体培养基需添加 2% 的琼脂, 1×10⁵ Pa 高温高压蒸汽灭菌。

1.3 菌株的分离与纯化

取 1 g 鳎草根际沉积物置于 100 mL 选择性 SRSM 液体培养基中, 于 30℃ 下 180 r/min 振荡培养 24 h。将富集后的菌液稀释成不同梯度(10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵), 吸取 100 μL 菌液涂布于固体改良 SRSM 培养基, 每个梯度重复 3 次, 30℃ 恒温培养 48 h, 选取单一菌落多次划线纯化保存备用。

1.4 溶磷菌的鉴定

将纯化的菌株接种于 LB 固体培养基上, 30℃ 倒置培养 24 h, 观察菌落形态并进行革兰氏染色, 于油镜下观察菌体形态特征。参照《伯杰氏细菌鉴定手册》^[19]分析菌株的生理生化特征。

采用全式金 Easy Pure Bacteria DNA Kit 提取菌株 DNA。以提取的细菌 DNA 为模板, 以细菌 16S rDNA 全序列通用引物 PolF/PolR 进行 PCR 扩增, 16S rDNA 全序列扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 10 min。取 2 μL PCR 产物, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行产物验证。扩增产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序, 所得序列在 NCBI 数据库中利用 Blast 软件完成相似性对比, 选择相似性高的序列利用 MEGA5.0 进行系统发育分析。

1.5 菌株溶磷能力测定

1.5.1 菌株溶磷能力定性测定 将纯化的菌株用灭菌牙签接种于 SRSM 固体培养基上, 置于 30℃ 恒温培养箱中倒置培养 3 d, 测量其溶磷圈直径

(D)和菌落直径(d),根据比值(D/d)初步判断各菌株溶磷能力强弱。

1.5.2 菌株溶磷能力定量测量 将纯化的菌株接种到 50 mL LB 培养基中, 30 °C, 180 r/min 培养 24 h 后, 10000 r/min 离心 10 s, 所得固体用 2% 生理盐水稀释至 $OD_{600\text{ nm}}=1$ 。取其中 250 μL 菌液置于 250 mL SRSM 培养基中, 30 °C, 180 r/min 振荡培养 12 h、24 h 及 48 h, 测定上清液中可溶性磷酸盐的含量。

1.6 菌株生长曲线的测定

取 $OD_{600\text{ nm}}=1$ 的菌液 1 mL 接种于 50 mL LB 液体培养基中, 分别在各菌株最适生长条件下培养 0 h、2 h、4 h、6 h、8 h、10 h、12 h、14 h、16 h、18 h、20 h、22 h、24 h, 每个时间段重复 3 次。以空白 LB 液体培养基为对照, 测定不同菌株各时间段 OD_{600} 值。以菌株培养时间为横坐标, 以 OD_{600} 值为纵坐标绘制菌株生长曲线。

1.7 溶磷菌培养条件的研究

1.7.1 温度 各取 $OD_{600\text{ nm}}=1$ 的菌液 1 mL 接种于 200 mL LB 液体培养基中, 分别于 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、37 °C 及 40 °C, 180 r/min 振荡培养 18 h, 每个温度重复 3 次, 测定其 OD_{600} 值。

1.7.2 pH 各取 $OD_{600\text{ nm}}=1$ 的菌液 1 mL 接种于 200 mL 初始 pH 为 5、6、7、8、9、10 的 LB 液体培养基中, 30 °C, 180 r/min 振荡培养 18 h, 每个 pH 重复 3 次, 测定其 OD_{600} 值。

1.7.3 盐度 各取 $OD_{600\text{ nm}}=1$ 的菌液 1 mL 接种于 200 mL 初始盐度(以氯化钠计)为 0、5、10、15、20、25、30、35、40 的 LB 液体培养基中, 30 °C, 180 r/min 振荡培养 18 h, 每个盐度重复 3 次, 测定其 OD_{600} 值。

1.8 溶磷菌对鳗草生长的影响

实验于 2018 年 5—6 月进行, 采用室外盆栽实验的方法, 初步探究溶磷菌对鳗草生长的影响。盆栽实验处理分为不接种对照 D, 分别接种菌株 P1、P2、P3、P4, 每个处理设置 8 个重复, 每个重复随机选取长势良好且具有相似形态学特征(株高 15~20 cm, 叶片数 3~4, 根状茎 4 cm)的 10 株鳗草植株, 每盆装有 4.5 kg 原生土壤。溶磷菌接种量为每盆 50 mL 菌悬液(10^6 CFU/mL)。实验

在室外的玻璃水槽中进行, 相同处理的每 4 个重复置于同一个玻璃水槽, 且各组及重复每天随机变换水槽摆放位置以减少光照误差。实验时, 所有鳗草植株采用针孔法标记。针孔位置位于植株维管束顶端即分生组织上方 1 cm 处。实验持续 30 d。实验结束后, 观察计算各组存活率; 测定新生叶长、茎节长、地上地下生产力等植株生长指标, 测定方法参照 Zhao 等^[6]; 测定光合色素、可溶性糖等植株生理指标, 测定方法参照王文杰等^[20]和张凌宇^[21], 测定光合色素时, 选择新生第二片叶中间部分; 用 Solarbio 土壤酶试剂盒测定土壤脱氢酶、脲酶、碱性磷酸酶等土壤酶活性; 参照中华人民共和国海洋监测规范(GB17378.4-2007)测定间隙水中氨氮、硝酸盐、磷酸盐含量。

1.9 数据分析

数据均以平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm \text{SE}$)表示, 采用 SPSS 17.0 进行单因素方差分析(one-way ANOVA), 若差异显著则进行 Tukey 多重比较分析组间差异。显著性水平 $\alpha=0.05$ 。分析结果使用 origin 8.5 软件绘图。

2 结果与分析

2.1 溶磷菌菌株形态学及生理生化特征

通过富集培养及稀释涂布, 从天鹅湖鳗草根际沉积物中分离得到 15 株具有潜在溶磷能力的菌株。通过复筛及进一步纯化, 删除部分降低或失去溶磷能力的菌株, 最终获得 4 株具有稳定溶磷能力的菌株, 分别命名为 P1、P2、P3 及 P4。菌株形态学特征见表 1, 生理生化特征见表 2。

2.2 菌株 16S rDNA 序列 PCR 扩增及其系统发育分析

菌株 P1~P4 的 16S rDNA 序列测序结果上传至 NCBI 的 GenBank 数据库, 通过 BLAST 对比, 选取与菌株 P1~P4 同源性相近菌株的 16S rDNA 序列构建系统发育进化树(图 1)。结合菌株形态学、生理生化特征综合分析, 菌株 P1 与 *Bacillus altitudinis* 41KF2b(ASJC01000029)的相似度大于 99%, 鉴定菌株 P1 为高山芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*), 命名为 *Bacillus altitudinis* P1, 属厚壁菌门(Firmicutes), 芽孢杆菌纲(Bacilli), 芽孢杆菌目

表 1 4 株溶磷菌株的形态学特征

Tab. 1 The morphological characteristic of the four phosphate-solubilizing bacteria

菌株编号 strain number	P1	P2	P3	P4
革兰氏染色 gram strain	G ⁺	G ⁻	G ⁻	G ⁻
菌落颜色 colony colour	黄色 yellow	黄色 yellow	浅黄色 light yellow	浅黄色 light yellow
菌落直径/cm colony diameter	0.18±0.003	0.15±0.008	0.14±0.003	0.22±0.004
菌落黏稠度 colony viscosity	微湿润 slight wet	湿润 wet	干燥 dry	半干燥 half dry
菌体形态 strain morphology	杆状 rod	杆状 rod	杆状 rod	杆状 rod

表 2 4 株溶磷菌株的生理生化特征

Tab. 2 Physiological and chemical characteristics of the four phosphate-solubilizing bacteria

生理生化特征 physiological and chemical characteristic	P1	P2	P3	P4
吲哚实验 indole production	-	+	-	-
甲基红 methyl red	+	+	+	-
V-P 反应 voges-proskauer reaction	-	-	-	+
明胶水解 gelatin liquefaction	+	-	+	-
柠檬酸盐 citrate	-	-	-	-
接触酶 catalase test	+	+	+	+
氧化酶 oxidase	+	-	-	-

(Bacillales), 芽孢杆菌科(Bacillaceae), GenBack 登录号为 MH790144; 菌株 P2 与 *Enterobacter mori* LMG 25706(GL890774)的相似度大于 99%, 鉴定

菌株 P2 为桑肠杆菌(*Enterobacter mori*), 命名为 *Enterobacter mori* P2, 属变形菌门(Proteobacteria), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria), 肠杆菌目(Enterobacterales), 肠杆菌科(Enterobacteriaceae), GenBank 登录号为 MH790145; 菌株 P3 与 *Escherichia coli* NCTC9001(LN831047)的相似度大于 99%, 鉴定菌株 P3 为大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*), 命名为 *Escherichia coli* P3, 属变形菌门(Proteobacteria), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria), 肠杆菌目(Enterobacterales), 肠杆菌科(Enterobacteriaceae), GenBank 登录号为 MH790147; 菌株 P4 与 *Cobetia marina*_DSM 4741(AJ306890)的相似度大于 99%, 鉴定菌株 P4 为 *Cobetia marina*, 命名为 *Cobetia marina* P4, 属变形菌门

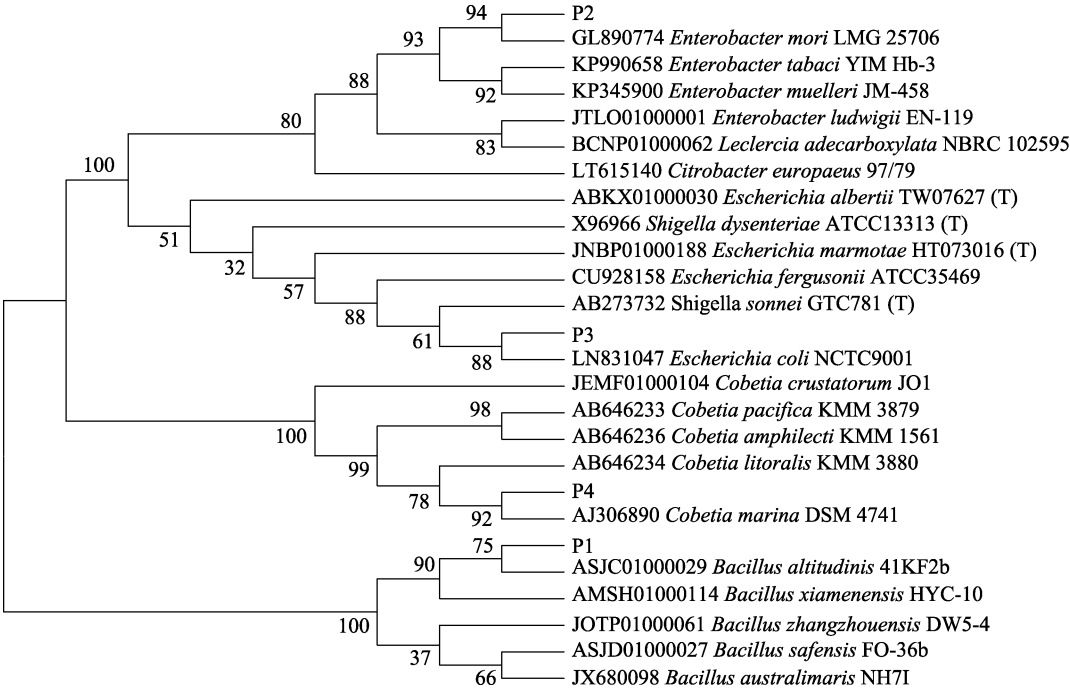


图 1 4 株溶磷菌株及其相关菌株的 16S rDNA 序列系统发育进化树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the four phosphate-solubilizing strains based on the 16S rDNA sequences of related species

(Proteobacteria), γ -变形菌纲(Gammaproteobacteria), 海洋螺菌目 (Oceanospirillales), 盐单胞菌科 (Halomonadaceae), GenBank 登录号为 MH790205。

2.3 溶磷能力鉴定

4 株菌株培养 3 d 后产生的溶磷圈直径与菌落直径比值(D/d)见表 3。溶磷圈是指溶磷菌溶解固体培养基中难溶磷酸盐而在菌落四周形成的透明圈。根据溶磷圈直径与菌落直径的比值大小,可初步判断溶磷菌分解难溶磷酸盐能力的强弱。结

果显示,溶磷圈直径与菌落直径最大比值 3.04 ± 0.09 ,为菌株 P3;最小值 1.80 ± 0.03 ,为菌株 P4,。

4 株菌株在接种 12 h 后,开始测定细菌培养液中可溶性磷酸盐的含量。结果如表 2 所示,随着时间延长,细菌培养液中可溶性磷酸盐含量逐渐升高,其中 12~48 h 增长迅速,而 48~72 h 间增长趋于平稳。3 d 后菌株 P3 培养液中可溶性磷酸盐含量最高,为 (130.21 ± 3.26) mg/L,菌株 P4 培养液中可溶性磷酸盐含量最低,为 (76.54 ± 1.35) mg/L。

表 3 溶磷菌的溶磷能力
Tab. 3 Solubilization capacity for insoluble phosphates of the four phosphate-solubilizing bacteria

n=4; $\bar{x} \pm SE$

菌株编号 strain number	溶磷圈与菌落直径比值 ratio of halo diameter to colony diameter	溶磷量/(mg/L) phosphate solubilization capacity			
		12 h	24 h	48 h	72 h
P1	2.62	46.60±1.74	97.51±2.42	116.93±2.44	116.98±2.86
P2	3.03	61.72±3.40	95.10±2.24	116.93±1.91	123.13±1.62
P3	3.04	48.67±2.47	102.92±2.30	128.52±1.72	130.21±3.26
P4	1.80	5.17±2.33	39.93±1.61	67.53±3.53	76.54±1.35

2.4 菌株典型生长曲线

比浊法、菌落平板计数法和显微镜直接计数法是测定微生物生长状况的常用方法,其中比浊法是通过测定细菌培养液在 600 nm 下的吸光值,反映细菌生长发育特征^[22]。结果如图 2 所示,菌株 P1 经过 0~4 h 延迟期后,4~14 h 进入了快速繁殖的对数期,24 h 内并未出现衰亡阶段。菌株 P2 经过 0~2 h 延迟期后,2~14 h 进入快速繁殖的对数期,14~20 h 保持 6 h 的稳定期,20 h 后进入衰亡期。菌株 P3 经过 0~2 h 延迟期后,2~12 h 进入快速繁殖的对数期,12~22 h 保持 10 h 的稳定期,22 h 后进入衰亡期。菌株 P4 经过 0~6 h 延迟期后,

6~14 h 进入快速繁殖的对数期,14~20 h 保持 8 h 的稳定期,20 h 后进入衰亡期。

2.5 菌株的最优培养条件

2.5.1 温度对溶磷菌生长的影响 如图 3 所示,4 株溶磷菌株在温度为 15~37℃ 范围内均能生长,其中菌株 P1、P4 的温度适应性较广,温度 40℃ 时也能生长,而菌株 P2、P3 在 40℃ 已几乎停止生长。根据理论曲线计算,菌株 P1~P4 的最适生长温度分别为 34.67℃、33.95℃、34.60℃ 及 31.19℃。

2.5.2 盐度对溶磷菌生长的影响 如图 4 所示,菌株 P1~P4 在 5~40 的盐度范围内均能正常生长,并呈现先升高再降低的趋势,适宜生长盐度范围为 20~35。菌株间的最适盐度存在差异,菌株 P1、P2 在盐度为 30 时,对应的 OD₆₀₀ 值最高,而菌株 P3、P4 分别在盐度为 35 及 25 时最高。根据理论曲线计算,菌株 P1~P4 最适生长盐度分别为 27.10、28.29、29.54 及 26.08。

2.5.3 pH 对溶磷菌生长的影响 如图 5 所示,4 株菌株的 pH 适应范围不同。菌株 P1、P2 和 P3 在 pH 5~7 范围内仍有较高的生长量,且菌株 P1 和 P2 在 pH 10 时仍能缓慢生长,表明其具有较高

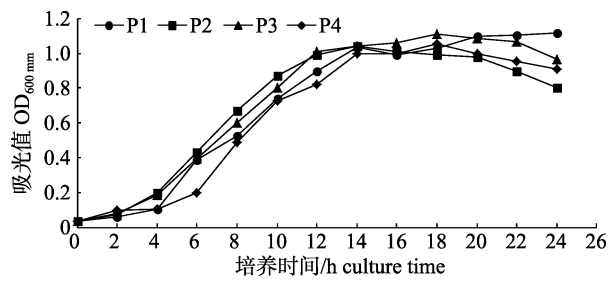


图 2 4 株溶磷菌株典型生长曲线
Fig. 2 Typical growth curves of the four phosphate-solubilizing bacteria

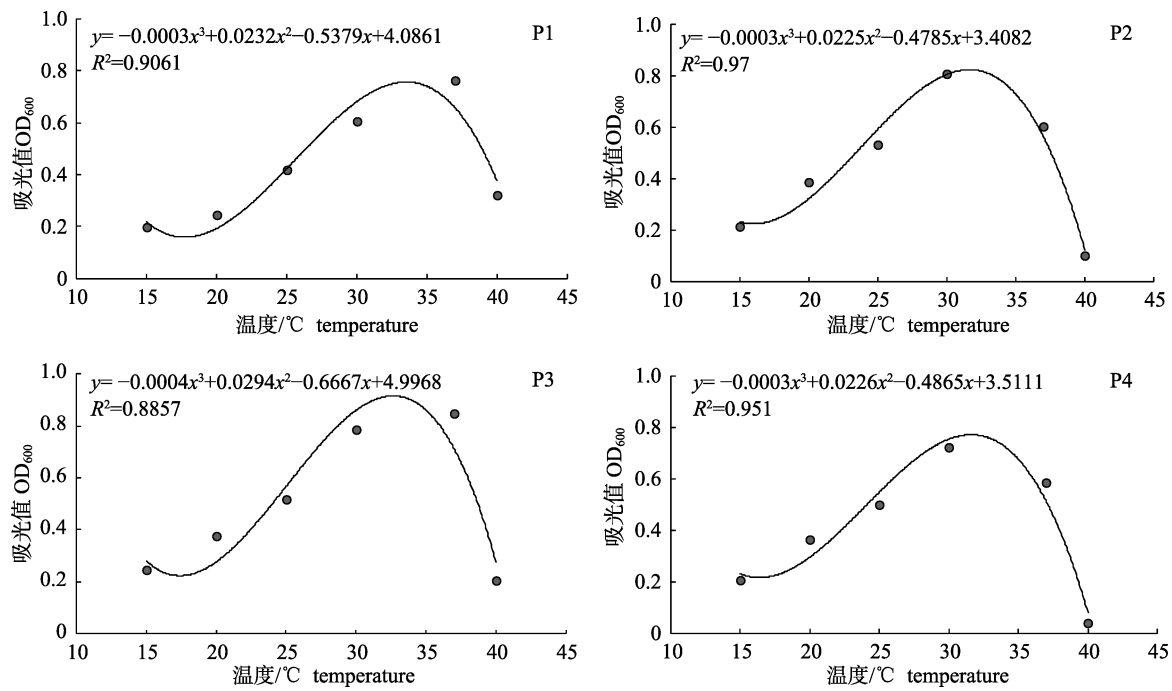


图 3 温度对 4 株溶磷菌株生长的影响
Fig. 3 Effect of temperature on the growth of the four phosphate-solubilizing bacteria

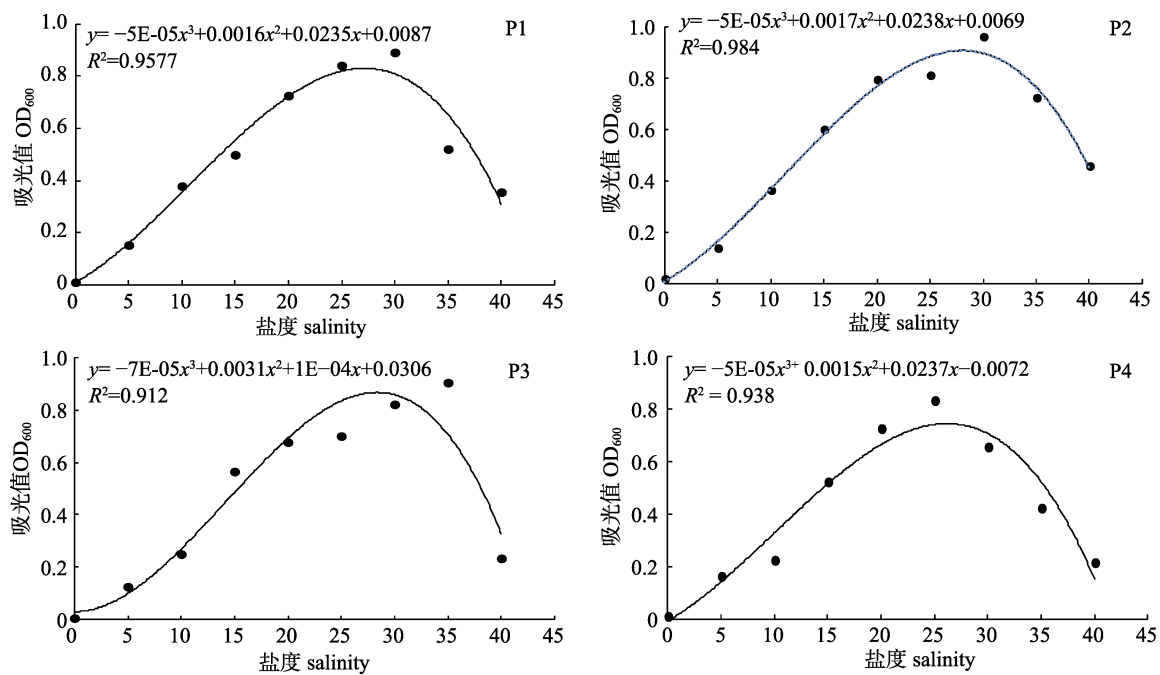


图 4 盐度对 4 株溶磷菌株生长的影响
Fig. 4 Effect of salinity on the growth of the four phosphate-solubilizing bacteria

的 pH 适应能力。但 4 株菌株在 pH 大于 9 之后生长速度急剧下降, 其中菌株 P3、P4 在 pH 10 时已停止生长。根据理论曲线计算, 4 株溶磷菌株的最适 pH 分别为 8.26、7.92、8.17 及 8.21。

2.6 溶磷菌对鳗草生长的影响
2.6.1 溶磷菌对鳗草存活率的影响 鳗草植株存活率变化如图 6 所示。与对照组相比, 接种处理组均能提高鳗草植株存活率。增长范围在 10.17%~

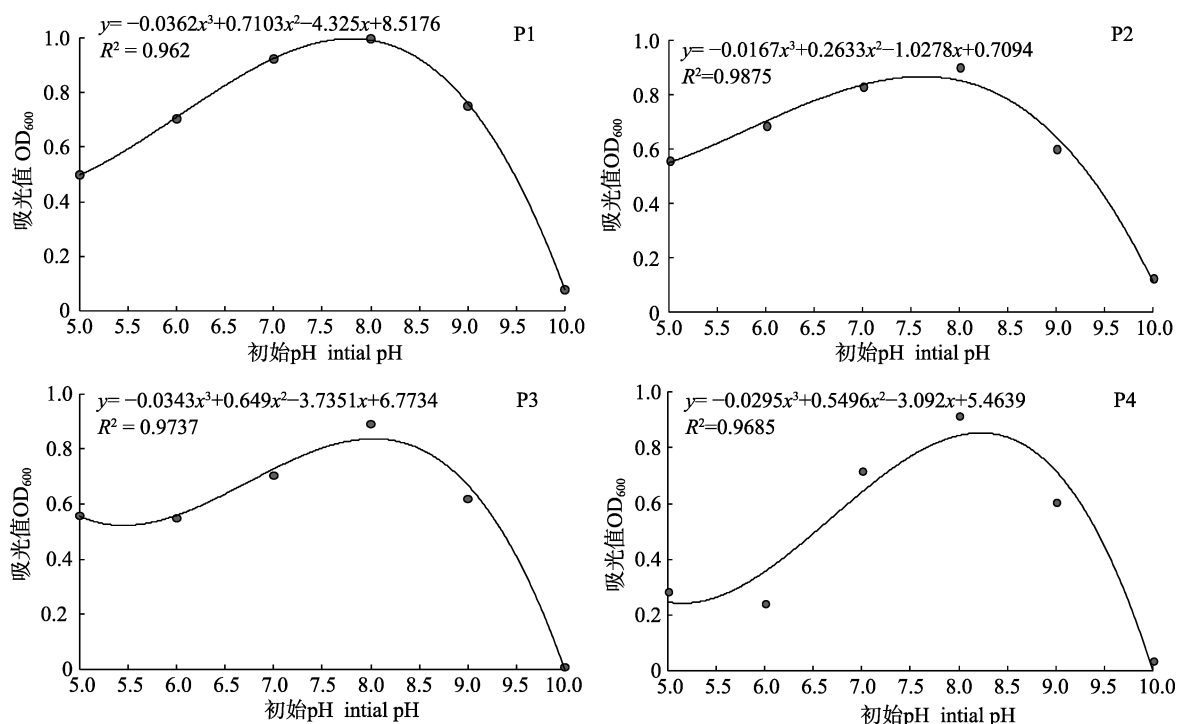


图 5 初始 pH 对 4 株溶磷菌株生长的影响

Fig. 5 Effect of initial pH on the growth of the four phosphate-solubilizing bacteria

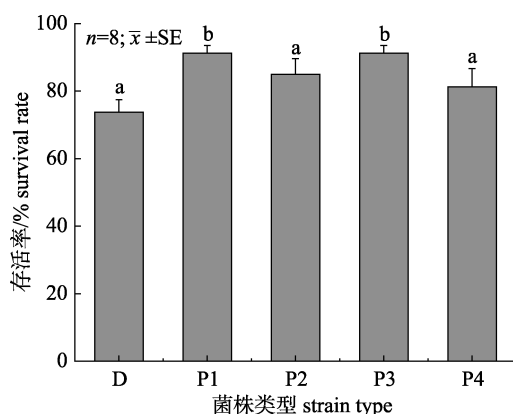


图 6 不同溶磷菌株对鳗草植株存活率的影响

误差线上不同字母表示不同组间存在显著差异 ($P < 0.05$).Fig. 6 Effect of different phosphate-solubilizing bacteria on the survival of *Zostera marina*Different letters on the error bars indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

23.73%, 其中菌株 P1、P3 处理组的存活率显著高于对照组与其余两组 ($P < 0.05$), 而菌株 P2、P4 处理组与对照组间无显著差异 ($P > 0.05$).

2.6.2 溶磷菌对鳗草生长指标的影响 鳗草植株的单株新叶面积、新茎节长、新根长、地上及地下生产力变化因菌株种类不同而有所差异, 其中鳗草单株新叶面积、地上及地下生产力对外源接

种溶磷微生物的响应程度较高(图 7)。与对照组相比, 接菌处理组均能显著提高鳗草的单株新叶面积 ($P < 0.05$), 增长范围在 52.81%~177.09%, 且菌株 P1~P3 处理组单株新叶面积显著高于 P4 处理组。单株新叶面积最高值出现在菌株 P2 处理组, 为 $(54.31 \pm 4.79) \text{ cm}^2$, 为对照组 $(19.60 \pm 2.08) \text{ cm}^2$ 的 2.77 倍。菌株 P1~P3 处理组鳗草植株地上生产力分别为 $(3.17 \pm 0.27) \text{ mg}/(\text{shoot} \cdot \text{d})$ 、 $(3.58 \pm 0.36) \text{ mg}/(\text{shoot} \cdot \text{d})$ 及 $(3.33 \pm 0.19) \text{ mg}/(\text{shoot} \cdot \text{d})$, 显著高于对照组和菌株 P4 处理组 ($P < 0.05$)。地下生产力最高值出现在菌株 P2 处理组, 为 $(0.28 \pm 0.04) \text{ mg}/(\text{shoot} \cdot \text{d})$, 显著高于对照组 $[(0.16 \pm 0.01) \text{ mg}/(\text{shoot} \cdot \text{d})]$, $P < 0.05$, 但与其他处理组间无显著差异 ($P > 0.05$)。除菌株 P2 处理组, 其余接菌处理组与对照组间也无显著差异 ($P > 0.05$)。另外, 4 个处理组鳗草新根长和新茎节长与对照组相比并无显著差异 ($P > 0.05$), 说明鳗草新根长和新茎节长对外源溶磷菌添加响应迟缓。

2.6.3 溶磷菌对鳗草生理指标的影响 鳗草叶片中 4 类光合色素含量的变化如图 8 所示。与对照组相比, 各接菌处理组均能提高鳗草叶片中光合色素含量。菌株 P2、P3 处理组 4 种光合色素含量

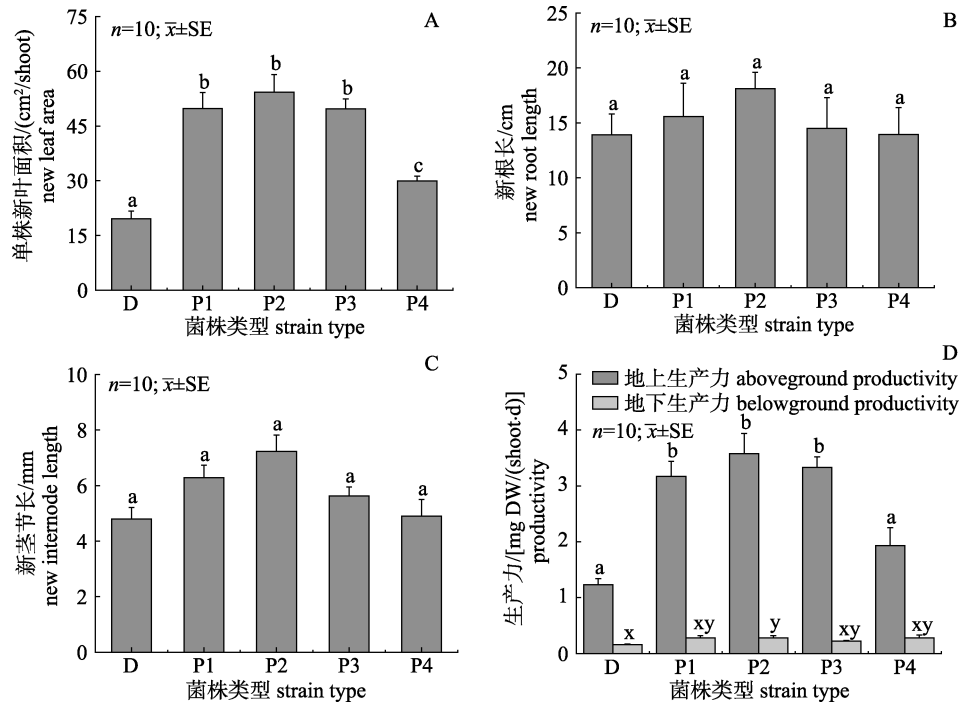


图 7 不同溶磷菌株对鳗草植株生长指标的影响

A. 单株新叶面积; B. 新根长; C. 新茎节长; D. 生产力. 误差线上不同字母表示不同组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 7 Effect of different phosphate-solubilizing bacteria on the growth performance of *Zostera marina*

A. New leaf area; B. New root length; C. New internode length; D. Productivity. Different letters on the error bars indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

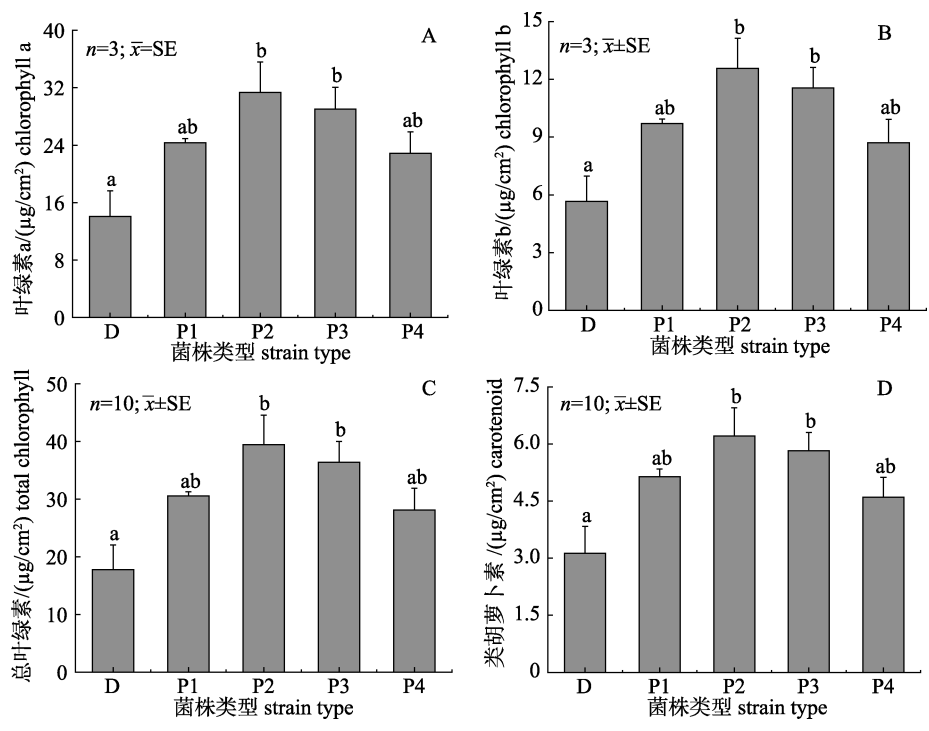


图 8 不同溶磷菌株对鳗草叶片光合色素含量的影响

A. 单株新叶面积; B. 新根长; C. 新茎节长; D. 生产力. 误差线上不同字母表示不同组间存在显著差异($P<0.05$).

Fig. 8 Effect of different phosphate-solubilizing bacteria on photosynthetic pigment content of *Zostera marina* leaves

A. New leaf area; B. New root length; C. New internode length; D. Productivity. Different letters on the error bars indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

增长效果最明显,显著高于对照组及 P1、P4 处理组($P<0.05$)。叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素和类胡萝卜素含量最高值均出现在菌株 P2 处理组,分别为 $31.35\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $12.57\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 、 $39.42\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及 $6.21\text{ }\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。鳗草叶片中可溶性糖含量结果如图 9 所示。菌株 P2 处理组叶片中可溶性糖含量高达 85.04 mg/g ,与对照组相比增加了 39.41% ,显

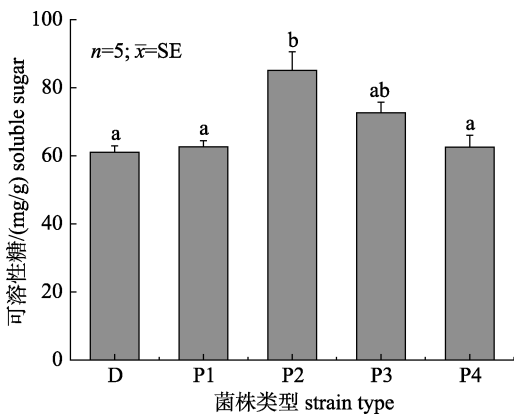


图 9 不同溶磷菌株对鳗草叶片可溶性糖含量的影响
误差线上不同字母表示不同组间存在显著差异($P<0.05$).
Fig. 9 Effect of different phosphate-solubilizing bacteria on soluble sugar content of *Zostera marina* leaves
Different letters on the error bars indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

著高于对照组及 P1、P4 处理组($P<0.05$)。其余各组与对照组间无显著差异($P>0.05$)。

2.6.4 溶磷菌对土壤酶活力及间隙水中营养盐含量的影响 4 种溶磷菌接种后鳗草根际土壤中脲酶和碱性磷酸酶活力如表 4 所示。除菌株 P4 处理组外,其余各处理组的碱性磷酸酶活力均显著高于对照组($P<0.05$),其中最高值出现在菌株 P2 处理组 [$13037.76\text{ nmol}/(\text{d}\cdot\text{g})$],为对照组 [$5778.59\text{ nmol}/(\text{d}\cdot\text{g})$] 的 2.26 倍。同时菌株 P2 处理组的碱性磷酸酶活力也显著高于菌株 P4 处理组($P<0.05$),但菌株 P4 处理组与其余处理组间无显著差异($P>0.05$)。各接菌处理组的土壤脲酶活力虽有一定程度增加,但与对照组相比并无显著差异($P>0.05$)。土壤间隙水中可溶性氮磷含量结果如表 4 所示。除菌株 P3 处理组外,其余接菌处理组均能增加土壤间隙水中磷酸盐含量,增长范围在 $28.85\%\sim 60.79\%$,但各接菌处理组与对照组间均无显著差异。接菌处理组土壤间隙水中硝酸盐和氨氮含量也均有所下降,其中对照组中氨氮含量显著高于各接菌处理组($P<0.05$),最低值出现在菌株 P2 处理组,仅为对照组的 51.27% 。而各组间硝酸盐含量并无显著差异($P>0.05$)。

表 4 不同溶磷菌株对土壤酶活性及间隙水中营养盐含量的影响

Tab. 4 Effect of different phosphate-solubilizing bacteria on enzyme activity and nutrient salt concentrations in porewater of soil					
n=6; x̄±SE					
处理 treatment	磷酸盐含量/(mg/L) phosphate content	硝酸盐含量/(mg/L) nitrate content	氨氮含量/(mg/L) ammonia nitrogen content	碱性磷酸酶活力/[nmol/(d·g)] alkaline phosphatase activity	脲酶活力/(U/g) urease activity
D	4.54±0.30	19.86±3.65	0.29±0.02 ^a	5778.59±370.90 ^a	90.45±12.24
P1	6.27±0.95	11.66±0.88	0.16±0.02 ^b	11092.19±822.79 ^{bc}	98.54±10.80
P2	7.30±1.29	8.99±1.05	0.15±0.01 ^b	13037.76±2098.60 ^b	111.19±16.74
P3	4.28±0.53	11.54±3.88	0.19±0.01 ^b	6124.26±699.40 ^{ac}	98.32±19.58
P4	5.85±1.57	12.74±4.55	0.22±0.01 ^b	10982.07±540.79 ^{bc}	97.77±4.13

注:不同上标字母表示不同组间存在显著差异($P<0.05$).
Note: Different superscript letters indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 鳗草根际溶磷微生物的分离及其初步应用研究

本研究以山东威海天鹅湖鳗草为研究对象,利用 SRSM 固体培养基从其根际分离得到 4 株溶磷菌株:芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis* P1)、桑肠杆

菌(*Enterobacter mori* P2)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli* P3)和 *Cobetia marina* P4,并对其溶磷能力进行定性定量测定,为鳗草海草床微生物修复提供了理论和技术支持。海草床具有较高的生产力水平,可溶性磷是促进其生产力发展的主要营养元素^[23],而附着在植物根际的溶磷微生物不仅可以通过分泌小分子有机酸、质子交换及

络合作用等途径缓解磷对植物初级生产力的限制, 其在促进植株生长, 生物防治病害等方面也发挥着重要作用, 目前在主要经济和生态物种中已被广泛研究^[24-26]。Teymouri 等^[27]自红树根际分离得到 13 株溶磷菌株, 7 d 内 PSB10 的溶磷量达到 357 mg/L 且随产酸量的增加, 溶磷作用增强。Ghosh 等^[14]从喜盐草(*Halophila ovalis*)和羽叶二药藻(*Halodule pinifolia*)根际分离得到的 6 株溶磷菌中芽孢杆菌(*Bacillus circulans* PSSG2)在 168 h 内的溶磷量最高, 为 375 mg/L。Paul 等^[28]对印度西孟加拉邦恒河中分离的溶磷菌的抑菌潜力进行了研究。结果表明, 绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12)对所有被检测的病原菌均有抑制作用。本研究从天鹅湖鳊草根际分离得到的 4 株溶磷菌株 72 h 内菌株培养液中可溶性正磷酸盐含量最高达 130.21 mg/L, 与已报道的溶磷菌溶磷能力相比, 具有良好的溶磷性能, 表明其在水天鹅湖鳊草海草床生态系统的磷和营养物质循环中具有重要作用。

研究表明, 芽孢杆菌属(*Bacillus*)是植物根际常见促生菌属, 具有溶磷、固氮、抑病、分泌 IAA 及多种水解酶等多种功能, 在植物生长发育过程中发挥重要作用^[1, 29-32]。本研究获得的溶磷菌 P1 属于芽孢杆菌, 由于其能在逆境胁迫下形成芽孢而得以生存, 且具有较强的重金属抗性, 适用于溶磷菌肥的开发。黄秋斌等^[33]研究表明, 蜡样芽孢杆菌 B3-7 具有良好的生态适应性和防治小麦纹枯病的能力。Leite 等^[32]证实枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)能够诱导可可植株发生生理变化, 从而促进可可幼苗生长。Liu 等^[29]自葡萄根际筛选得到的阿耶波多氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhattai* JY17)和(*Bacillus aryabhattai* JY22)具有溶磷、固氮、分泌 IAA、ACC、壳多糖酶及蛋白酶等功能, 能够显著促进葡萄(*Vitis vinifera*)的生长。本研究分离得到的溶磷菌 P1 经过室外盆栽实验证实, 能显著提高鳊草植株的存活率、单株新叶面积和地上生产力等生长指标以及碱性磷酸酶活力等, 并且能显著促进鳊草根对氮元素的吸收。这与白文娟等^[34]的研究结果相一致。但菌株 P1 对鳊草叶片内光合色素及可溶性糖的含量并

无显著影响, 与 Leite 等^[32]的研究结果有所差异。推测可能与芽孢杆菌属内不同菌株特性有关。

肠杆菌(*Enterobacter*)是溶磷菌的主要类群之一, 其中阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)是目前研究最广的种类, 具有溶磷、分泌 ACC 转氨酶、合成植物激素 IAA 及防治病害等多种促生功能^[10, 35-36]。而本研究分离得到的桑肠杆菌(*Enterobacter mori* P2)其相似种首次分离自桑树根际, 目前关于其溶磷能力的研究还尚未有报道。研究结果显示, 桑肠杆菌固体培养时其溶磷系数为 3.03, 72 h 内菌株培养液中可溶性正磷酸盐的含量为 123.13 mg/L, 表明其具有较高的溶磷能力。虽然其溶磷能力低于菌株 P3, 但在对鳊草生长影响的研究中其促生效果最为显著, 单株新叶面积、地上及地下生产力均高于其余三个处理组且显著高于对照组。通过探究其叶片中叶绿素 a、叶绿素 b、总叶绿素、类胡萝卜素及可溶性糖含量的变化推测, 菌株 P2 可能通过提高鳊草光合作用能力促进鳊草的生长。但其具体的促生特性有待进一步研究。

菌株 P3 属于埃希氏菌属(*Escherichia*), 研究结果表明, 与其余 3 株菌株相比其溶磷能力最高, 72 h 菌株培养液中可溶性正磷酸盐含量高达 130.21 mg/L。但在对鳊草生长影响的研究中却发现其促生效果与实验条件下的溶磷能力不成正比, 且从间隙水中磷酸盐含量和土壤碱性磷酸酶活力可以推测, 在实际接种实验中菌株 P3 并未有效发挥其溶磷效果。通常实验条件下的溶磷能力是判定溶磷微生物作用效果的重要指标。但也有研究表明, 这二者间并无直接关系。Collavino 等^[37]研究发现, 溶磷菌的体外溶磷能力与菜豆(*Phaseolus garis*)的生长无关。Taurian 等^[38]对 110 株溶磷菌的研究结果表明, 仅有一株能促进花生(*Arachis hypogaea* L.)的生长。Fernández 等^[39]通过溶磷菌接种实验证实, 其筛选的 13 株高效溶磷菌株均不能促进大豆的生长和对磷等营养元素的吸收。但鳊草盆栽实验发现, 菌株 P3 虽然没有发挥其溶磷能力, 却能够显著促进鳊草的生长。在实验培养条件下, 溶磷菌与植物促生菌间的关系受多种因素共同影响, 除实际溶磷效果外, 其生

长代谢产物以及多种生物化学过程也是其作为植物促生菌的重要参考。因此盆栽及田野实验是证明溶磷菌作用效果最直接的方法。

Cobetia marina P4 属于 *Cobetia* 属, 目前 *Cobetia marina* DSM 4741 是其唯一种类, 关于其溶磷促生作用的研究还尚未有报道。研究结果表明, 菌株 P4 在 72 h 内菌株培养液中可溶性正磷酸盐含量为 76.54 mg/L, 与其他三株菌株相比, 溶磷能力较低。同时鳗草的室外盆栽实验表明, 菌株 P4 虽然能在一定程度上促进鳗草的生长, 但鳗草的各种生长生理指标及土壤养分变化等与对照组相比并无显著差异, 表明其作为溶磷菌肥的实际应用潜力较低。

3.2 溶磷菌最适培养条件优化

微生物的生长繁殖过程可分为延迟期、对数期、稳定期和衰亡期 4 个阶段。通过测定微生物的典型生长曲线, 可有效把握其 4 个阶段的生长繁殖规律并投入生产应用^[40]。已有研究表明, 菌株处于延迟期和稳定期时最具应用价值。王栋等^[41]研究发现, 米曲霉 *CICIMF0899* 在进入衰亡期前其代谢产物蛋白酶和淀粉酶的活力最高。Rezaei 等^[42]证实处于不同生长阶段的酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 功能效果不同。本研究表明, 菌株 P2~P4 均有明显的延迟期、对数期、稳定期和衰亡期的生长繁殖过程, 在时间节点上存在差异, 但菌株 P1 在 24 h 并未出现衰亡现象。

另有研究表明, 通过控制功能微生物人工培养环境的温度、盐度和初始培养 pH 可有效延迟其衰亡时间^[22]。本研究根据 4 株溶磷菌株的典型生长曲线, 明确了其最适培养温度、盐度及初始 pH, 研究结果为今后溶磷菌肥的研制积累了基础数据。

环境条件对微生物生长的影响主要集中在细胞酶活、细胞代谢、细胞膜结构以及生物大分子结构和功能等方面。不同种类及生境中微生物的环境耐受范围不同。本研究证实, 4 株固氮微生物在 15~37℃ 条件下均能正常生长, 其中菌株 P1、P4 的温度适应性较广, 温度 40℃ 时也能生长。盐度即渗透压对无细胞壁的细菌生长影响显著, 高渗和低渗均能抑制其生长繁殖^[43]。研究发现, 4 株

溶磷菌株在盐度 5~40 范围内均能正常生长, 最适生长盐度分别为 27.10、28.29、29.54 及 26.08。天鹅湖海水盐度在 29~30 之间, 表明菌株受高盐抑制作用更明显。在环境 pH 方面, 王同等^[44]研究了红壤中筛选得到的高效溶磷菌株苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis* B1) 的生长特性, 发现其最适生长 pH 5。伊鍈^[45]从玉米根际土壤中筛选得到的产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogene* PSB28) 在 pH 低于或高于 7 时均会抑制其溶磷能力, 证明了溶磷菌株只在适宜的环境下才具有溶磷作用。本研究发现, 除菌株 P4 外, 其余 3 株溶磷菌株在 pH 5~9 时均有较高的生长量, 最适生长 pH 分别为 8.26、7.92、8.17 及 8.21, 而高于 9 时, 菌株生长量均急剧下降。

4 结论

采用 SRSB 培养基从天鹅湖鳗草根际分离得到 4 株溶磷菌株, 从形态学、生理生化特征及 16S rDNA 等方面对菌株进行了鉴定, 探讨了菌株的最适培养条件, 并通过室外盆栽实验研究了其对鳗草生长的影响。结果表明, 桑肠杆菌 (*Enterobacter mori* P2) 和大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli* P3) 具有较高的溶磷能力和较广的环境适应范围, 且能够显著促进鳗草的生长。今后有望通过溶磷微生物肥料的研制, 发挥其在海草床生态系统恢复中的应用潜力。

参考文献:

- [1] Wang Q, Li W T, Zhang P D, et al. Isolation and characterization of nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of *Zostera marina* and optimization of its culture conditions[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(4): 791-801. [王琦, 李文涛, 张沛东, 等. 鳗草根际固氮菌的分离鉴定及培养条件的筛选[J]. 中国水产科学, 2017, 24(4): 791-801.]
- [2] Liu B J. Foundational studies on resource investigation and ecological restoration of eelgrass in typical bays in Shandong[D]. Qingdao: Institution of Oceanology, Chinese Academy Sciences, 2012: 163. [刘炳舰. 山东典型海湾大叶藻资源调查与生态恢复的基础研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2012: 163.]
- [3] Waycott M, Duarte C M, Carruthers T J B, et al. Accelerating loss of seagrasses across the globe threatens coastal eco-

- systems[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(30): 12377-12381.
- [4] Evans S M, Sinclair E A, Poore A G B, et al. Assessing the effect of genetic diversity on the early establishment of the threatened seagrass *Posidonia australis* using a reciprocal-transplant experiment[J]. Restoration Ecology, 2018, 26(3): 570-580.
- [5] Bastyan G R, Cambridge M L. Transplantation as a method for restoring the seagrass *Posidonia australis*[J]. Estuarine, Coastal and Shelf Science, 2008, 79(2): 289-299.
- [6] Zhao J S, Zhang Q, Liu J, et al. Effects of copper enrichment on survival, growth and photosynthetic pigment of seedlings and young plants of the eelgrass *Zostera marina*[J]. Marine Biology Research, 2016, 12(7): 695-705.
- [7] Yang C J, Liu Y S, Liu J, et al. Assessment of the establishment success of *Zostera marina* (eelgrass) from seeds in natural waters: Implications for large-scale restoration[J]. Ecological Engineering, 2016, 92: 1-9.
- [8] Abhijith R, Vennila A, Purushothaman C S. Occurrence of phosphate-solubilizing bacteria in rhizospheric and pneumatophoric sediment of *Avicennia marina*[J]. International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 2017, 5(4): 284-288.
- [9] Wang X H, Wang C D, Sui J K, et al. Isolation and characterization of phosphofungi, and screening of their plant growth-promoting activities[J]. AMB Express, 2018, 8: 63-75.
- [10] Zhao L F, Xu Y J, Cao D J, et al. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(13): 4425-4435. [赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 等. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生[J]. 生态学报, 2015, 35(13): 4425-4435.]
- [11] Xie H, Pasternak J J, Glick B R. Isolation and characterization of mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 that overproduce indoleacetic acid[J]. Current Microbiology, 1996, 32(2): 67-71.
- [12] Field C, Behrenfeld M, Randerson J. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components[J]. Science, 1998, 281(5374): 237-240.
- [13] Jiang Y F, Ling J, Dong J D, et al. The bacterial communities constitution and distribution in sediment of seagrass in Xincun Bay, South China Sea[J]. Journal of Biology, 2016, 33(6): 38-42. [江玉凤, 凌娟, 董俊德, 等. 南海新村湾海草沉积物细菌群落组成及分布[J]. 生物学杂志, 2016, 33(6): 38-42.]
- [14] Ghosh U, Subhashini P, Dilipan E, et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from seagrass rhizosphere soil[J]. Journal of Ocean University of China, 2012, 11(1): 86-92.
- [15] Niu S N, Zhang P D, Liu J, et al. The effect of temperature on the survival, growth, photosynthesis, and respiration of young seedlings of eelgrass *Zostera marina* L.[J]. Aquaculture, 2012, 350-353: 98-108.
- [16] Huang X P, Jiang Z J, Fan H Q, et al. The nomenclature of the “algae” name of seagrasses in China[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2016, 47(1): 290-294. [黄小平, 江志坚, 范航清, 等. 中国海草的“藻”名更改[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(1): 290-294.]
- [17] Vazquez P, Holguin G, Puente M E, et al. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon[J]. Biology and Fertility of Soils, 2000, 30(5-6): 460-468.
- [18] Deng Z S, Zhao L F, Kong Z Y, et al. Diversity of endophytic bacteria within nodules of the *Sphaerophysa salsula* in different regions of Loess Plateau in China[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 76(3): 463-475.
- [19] Garrity G M, Bell J A, Lilburn T G. Taxonomic Outline of the Prokaryotes Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. New York: Springer, 2004.
- [20] Wang W J, He H S, Guan Y, et al. Methodological comparison of chlorophyll and carotenoids contents of plant species measured by DMSO and acetone-extraction methods[J]. Bulletin of Botanical Research, 2009, 29(2): 224-229. [王文杰, 贺海升, 关宇, 等. 丙酮和二甲亚砜法测定植物叶绿素和类胡萝卜素的方法学比较[J]. 植物研究, 2009, 29(2): 224-229.]
- [21] Zhang L Y. Effects of three factors on seed dormancy in eelgrass (*Zostera marina* L.) and their mechanisms[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014: 82. [张凌云. 三种因子对大叶藻种子休眠的影响及其作用机理初步研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014: 82.]
- [22] Zhu Y L. Experimental method of bacteria growth curve determination[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(5): 108-112. [朱艳蕾. 细菌生长曲线测定实验方法的研究[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(5): 108-112.]
- [23] Fraser M W. Phosphorus availability and microbial driven decomposition in oligotrophic seagrass sediments[D]. Crawley: The University of Western Australia, 2016: 161.
- [24] Li L. Study on screening of phosphate-solubilizing bacteria from root zone soil of ginseng under forest and promoting effect on ginseng growth[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017: 55. [李乐. 林下山参根区土壤

- 溶磷菌的筛选及对人参生长作用的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017: 55.]
- [25] Zhang J, Wang P C, Fang L, et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from mushroom residues and their effect on tomato plant growth promotion[J]. Polish Journal of Microbiology, 2017, 66(1): 57-65.
- [26] Bakhshandeh E, Pirdashti H, Lendeh K S. Phosphate and potassium-solubilizing bacteria effect on the growth of rice[J]. Ecological Engineering, 2017, 103: 164-169.
- [27] Teymouri M, Akhtari J, Karkhane M, et al. Assessment of phosphate solubilization activity of Rhizobacteria in mangrove forest[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2016, 5: 168-172.
- [28] Paul D, Sinha S N. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India[J]. Annals of Agrarian Science, 2017, 15(1): 130-136.
- [29] Liu M, Liu X, Cheng B S, et al. Selection and evaluation of phosphate-solubilizing bacteria from grapevine rhizospheres for use as biofertilizers[J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2016, 14(4): e1106.
- [30] Chinheya C C, Yobo K S, Laing M D. Biological control of the rootknot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean[J]. Biological Control, 2017, 109: 37-41.
- [31] Joe M M, Devaraj S, Benson A, et al. Isolation of phosphate solubilizing endophytic bacteria from *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn: Evaluation of plant growth promotion and antioxidant activity under salt stress[J]. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, 2016, 3(2): 71-77.
- [32] Leite H A C, Silva A B, Gomes F P, et al. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(6): 2639-2651.
- [33] Huang Q B, Zhang Y, Liu F Y, et al. Colonization dynamics of *Bacillus cereus* B3-7 on wheat roots and control efficiency against sharp eyespot of wheat[J]. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(10): 2559-2566. [黄秋斌, 张颖, 刘凤英, 等. 蜡芽芽孢杆菌 B3-7 在大田小麦根部的定殖动态及其对小麦纹枯病的防治效果[J]. 生态学报, 2014, 34(10): 2559-2566.]
- [34] Bai W J, Hu R R, Zhang J E, et al. Effects of phosphate-solubilizing bacteria on growth and phosphorus uptake of corn seedling[J]. Ecological Science, 2014, 33(3): 401-407. [白文娟, 胡蓉蓉, 章家恩, 等. 溶磷菌对玉米苗期生长和磷素吸收的影响[J]. 生态科学, 2014, 33(3): 401-407.]
- [35] Ryu R J, Patten C L. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(21): 7200-7208.
- [36] Shah S, Li J P, Moffatt B A, et al. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1998, 44(9): 833-843.
- [37] Collavino M M, Sansberro P A, Mroginski L A, et al. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth[J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(7): 727-738.
- [38] Taurian T, Anzuay M S, Angelini J G, et al. Phosphate-solubilizing peanut associated bacteria: Screening for plant growth-promoting activities[J]. Plant and Soil, 2010, 329(1-2): 421-431.
- [39] Fernández L A, Zalba P, Gómez M A, et al. Phosphate-solubilization activity of bacterial strains in soil and their effect on soybean growth under greenhouse conditions[J]. Biology and Fertility of Soils, 2007, 43(6): 805-809.
- [40] Mittal S K, Goel S. BOD exertion and OD₆₀₀ measurements in presence of heavy metal ions using microbes from dairy wastewater as a seed[J]. Journal of Water Resource and Protection, 2010, 2(5): 478-488.
- [41] Wang D, Feng J, Zheng Z Y, et al. Characteristic comparison of two neutral proteases used for soy sauce fermentation[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2012, 31(5): 479-485. [王栋, 冯杰, 郑志永, 等. 酱油发酵用 2 种米曲霉中性蛋白酶的酶学性质比较[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5): 479-485.]
- [42] Rezaei M N, Dornez E, Jacobs P, et al. Harvesting yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) at different physiological phases significantly affects its functionality in bread dough fermentation[J]. Food Microbiology, 2014, 39: 108-115.
- [43] Chen Y F. Osmosis for the influence of bacteria[J]. Journal of Taiyuan Normal University (Natural Science Edition), 2012, 11(1): 136-139. [陈燕飞. 渗透压对细菌的影响[J]. 太原师范学院学报(自然科学版), 2012, 11(1): 136-139.]
- [44] Wang T, Kong L Y, Jiao J G, et al. Screening of phosphate-solubilizing bacteria in red soil and their acting mechanisms[J]. Acta Pedologica Sinica, 2014, 51(2): 373-380. [王同, 孔令雅, 焦加国, 等. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷机制[J]. 土壤学报, 2014, 51(2): 373-380.]
- [45] Yi Y. Screening of phosphorus-solubilizing strain and its phosphate dissolving mechanism[D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2011: 56. [伊莹. 高效解磷细菌的筛选及解磷机理的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2011: 56.]

Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria in the rhizosphere of eelgrass *Zostera marina* and promotion effect on eelgrass growth

ZHANG Xuemei¹, ZHANG Xiumei^{1,2}, LI Wentao¹

1. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education; Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266072, China

Abstract: Eelgrass (*Zostera marina*) beds, one of the most important coastal ecosystems, are highly ecologically and economically valuable. However, eelgrass beds have been reduced worldwide because of natural and anthropogenic causes. To restore the degraded eelgrass beds, numerous studies have been conducted and various techniques developed. Among them, eelgrass transplantation is the most widely used and intensively studied technology. Some studies have shown that appropriate artificial propagation methods can effectively promote the survival and growth of the transplants, and phosphate-solubilizing microorganisms not only provide phosphate for the growth of the plants, the metabolites also play a major role in promoting plant growth and controlling diseases. However, techniques for promoting the growth of transplanted eelgrass are still absent. Therefore, investigating phosphate-solubilizing bacteria within the eelgrass rhizosphere is necessary. In this study, the growth-promoting activities of the rhizobacteria of eelgrass were investigated, by isolating four phosphate-solubilizing bacteria (P1, P2, P3, and P4) from the rhizosphere sediments of eelgrass using an SRSM medium. Based on the morphological, physiological, and biochemical characteristics, and the sequence analysis of 16S rDNA, we identified P1 as *Bacillus altitudinis*, P2 as *Enterobacter mori*, P3 as *Escherichia coli*, and P4 as *Cobetia marina*. The optimal culture conditions and typical growth curves for the four rhizobium strains were established. The optimal temperatures for the growth of the four strains were 34.67°C, 33.95°C, 34.60°C, and 31.19°C, respectively. The optimal salinity for growth was 27.10, 28.29, 29.54, and 26.08, respectively. The optimal pH for growth was 8.26, 7.92, 8.17, and 8.21, respectively. A pot test was conducted to investigate the effects of the four phosphate-solubilizing bacteria strains on eelgrass growth. The results showed that the survival rate, growth, physiological status, and enzyme activity of the rhizosphere soil in the four inoculation treatments increased to some extent. Among the treatments P2 showed the best promoting effect, with the new leaf area, aboveground productivity, and belowground productivity being (54.31±4.79) cm², (3.58±0.36) mg/(shoot·d), and (0.28±0.04) mg/(shoot·d), respectively. Additionally, the contents of chlorophyll a, chlorophyll b, total chlorophyll, and carotenoids significantly increased in the P2 treatment with values of 31.35 µg/cm², 12.57 µg/cm², 39.42 µg/cm², and 6.21 µg/cm², respectively. Except for P4, the activity of alkaline phosphatase in all other inoculation treatments was significantly increased ($P<0.05$). However, no significant differences were observed in the soil urease activity between the inoculation and control treatments. A comprehensive analysis indicated that *E. mori* (the P2 strain) could be applied in the future development and application of microbial inoculants and seagrass phosphobacterial fertilizers, thereby benefitting the recovery of eelgrass beds in the future.

Key words: *Zostera marina*; phosphate-solubilizing bacteria; 16S rDNA; pot test; growth-promoting effect

Corresponding author: ZHANG Xiumei. E-mail: xiumei1227@163.com