

李学平,刘萍.盐碱化土壤中1株耐盐解磷放线菌的生物学特性[J].江苏农业科学,2015,43(8):363-365.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.118

盐碱化土壤中1株耐盐解磷放线菌的生物学特性

李学平,刘萍

(滨州学院资源环境系,山东滨州 256600)

摘要:采用平板法进行菌种初筛和生物学特性研究,经筛选纯化得到1株高效解磷菌F1312,对该菌株的生物学特性在碳源、氮源、温度、pH值等方面进行了初步研究,并采用L₉(3⁴)正交试验设计对发酵条件进行了初步探讨。结果表明:经筛选所得的菌株F1312初步判断为放线菌;对F1312进行生物学测定,该菌株在所供4种碳源、氮源、pH值、温度条件下均能生长,其最适碳源为麦芽糖,最适氮源为酵母浸膏粉,最适pH值为7,最适温度为30℃;在发酵条件的优化组合试验中,F1312的最适解磷条件为:pH值=7,温度30℃,碳氮比20:1,转速150 r/min。

关键词:高效解磷菌;生物学;解磷效果;正交试验;放线菌

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)08-0363-03

在土壤性质、作物类型、磷肥种类和用量等一系列因素的影响下,每年施入的磷大约有75%~90%积累在土壤中成为难溶形态的磷^[1],当季利用率一般仅为10%~25%^[2]。因此,如何提高磷肥利用率一直备受研究人员关注。

大量研究表明,土壤中的许多微生物都能够将植物难以吸收利用的无效磷转化为可吸收利用的有效磷形态^[3-5],这种微生物叫解磷菌。土壤中解磷菌能够增加磷酸钙的溶解性,提高土壤中的可溶性磷含量,从而提高植物对磷的利用效率,改善植物营养条件^[6]。对不同种类解磷微生物溶磷效果的研究发现,细菌、酵母、霉菌接种在不同磷源上时,表现出的溶磷能力不同^[7-11]。因此,研究解磷菌的解磷特性以及生物学特性,对促进植物生长发育以及解磷真菌在农学上的应用起着重要作用。本研究采集草坪根际土壤,对解磷菌进行筛选并进行生物学特性研究,并对发酵液条件优化组合进行研究,以探讨解磷菌的最适生长环境以及解磷的最适合条件。

1 材料与方法

1.1 供试样品

采集内陆盐碱地草坪根际土壤,采用抖土法将收集的土样放入密封袋内立刻带回实验室冷藏,备用。

1.2 培养基配方

收稿日期:2014-10-16

基金项目:山东省自然基金联合专项项目(编号:ZR2012CL05);国家级大学生创新训练计划项目(编号:201310449124);山东省自然科学基金(编号:ZR2013EEL001)。

作者简介:李学平(1978—),女,山东临沂人,博士,副教授,主要从事陆地环境微生物研究。E-mail:lixueping2008@163.com。

[15]王翠.产菊粉酶菌株的筛选及菊粉酶性质的研究[D].天津:天津科技大学,2010:8-10.

[16]王建华,刘艳艳,姚斌,等.高产菊粉酶酵母筛选、发酵和酶学性质研究[J].生物工程学报,2000,16(1):60-64.

[17]王琳.产菊粉酶菌株的筛选及其酶学特性的研究[D].南京:南京农业大学,2007:6-11.

1.2.1 基础培养基 本试验中菌种初筛用的是有机磷固体培养基和无机磷固体培养基,配方如下:(1)有机磷固体培养基:葡萄糖10 g,(NH₄)₂SO₄ 0.5 g,NaCl 0.3 g,KCl 0.3 g,MgSO₄·7H₂O 0.003 g,FeSO₄·7H₂O 0.03 g,MnSO₄·4H₂O 0.01 g,CaCO₃ 5 g,卵磷脂0.2 g,琼脂15~20 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.5。(2)无机磷固体培养基:葡萄糖10 g,(NH₄)₂SO₄ 0.5 g,NaCl 0.3 g,KCl 0.3 g,MgSO₄·7H₂O 0.003 g,FeSO₄·7H₂O 0.03 g,MnSO₄·4H₂O 0.01 g,Ca₃(PO₄)₂ 5 g,琼脂15~20 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.5。

1.2.2 保存培养基 菌种保存时用到的培养基为斜面培养基,其配方为:葡萄糖15 g,NaNO₃ 1 g,K₂HPO₄ 0.5 g,KCl 0.25 g,MgSO₄·7H₂O 0.25 g,FeSO₄·7H₂O 0.005 g,琼脂8 g,蒸馏水500 mL,自然pH值。

1.2.3 复筛培养基 菌种复培(纯化)时用的培养基为有机磷液体培养基和无机磷液体培养基,配方为:(1)有机磷液体培养基:葡萄糖10 g,(NH₄)₂SO₄ 0.5 g,NaCl 0.3 g,KCl 0.3 g,MgSO₄·7H₂O 0.003 g,FeSO₄·7H₂O 0.03 g,MnSO₄·4H₂O 0.01 g,CaCO₃ 5 g,卵磷脂0.2 g,蒸馏水1 000 ml,pH值7.0~7.5。(2)无机磷液体培养基:葡萄糖10 g,(NH₄)₂SO₄ 0.5 g,NaCl 0.3 g,KCl 0.3 g,MgSO₄·7H₂O 0.003 g,FeSO₄·7H₂O 0.03 g,MnSO₄·4H₂O 0.01 g,Ca₃(PO₄)₂ 5 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.5。

1.2.4 活化培养基 经过观察,知道纯化所得的菌种为放线菌类,所以活化时用到的培养基为高氏培养基,其配方为:葡萄糖20 g,KNO₃ 1 g,K₂HPO₄ 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,NaCl 0.5 g,FeSO₄·7H₂O 0.01 g,琼脂20 g,蒸馏水1 000 mL,pH值7.0~7.5。

[18]宁泊英.两种常用农药对叶际微生物群落结构的影响及叶面农药残留的原位降解研究[D].北京:中国科学院研究生院,2010:26~28.

[19]Pandey A,Soccol C R,Selvakumar P,et al. Recent developments in microbial inulinases. Its production, properties, and industrial applications [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,1999,81(1): 35-52.

值 7.4~7.6。

1.2.5 发酵培养基 发酵条件优化组合采用的培养基为无机培养基和有机培养基,配方为:(1)有机培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, CaCO_3 5 g, 卵磷脂 0.2 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.5。(2)无机培养基:葡萄糖 10 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.003 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0~7.5。

以上培养基制作完成之后均须在高压灭菌锅中,于 121 °C, 0.103 MPa 条件下灭菌 20 min。

1.2.6 发酵条件优化组合 本试验中发酵条件优化组合采用的是 4 因素(温度、pH 值、碳氮比、转速)3 水平的正交试验(表 1)。根据试验结果,综合分析确定菌株生长的最适条件。

表 1 菌株发酵条件正交试验设计

序号	温度(°C)	pH 值	碳氮比	转速(r/min)
1	25	7	30:1	100
2	25	8	20:1	150
3	25	9	5:1	100→150→100*
4	30	7	20:1	100→150→100*
5	30	8	5:1	100
6	30	9	30:1	150
7	35	7	5:1	150
8	35	8	30:1	100→150→100*
9	35	9	20:1	100

注: * 摆床设置转速为 0~70 h 为 100 r/min, 70~160 h 为 150 r/min, 160~190 h 为 100 r/min。

1.3 菌株筛选

1.3.1 初筛 按照培养基配方与配量分别称取各药品,取少于总量的水于烧杯中,将各培养基成分(琼脂除外)逐一加入水中待溶;将烧杯放在石棉网上文火加热,并不断搅拌,使各药品快速溶解,然后补充水分至所需配培养基的量;用 1 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7.0~7.5;将配置好的培养基分装在锥形瓶内,加上棉塞包装灭菌。高压灭菌后倒平板,次日,将采集的土壤过筛磨细,称取 10 g 样品,进行梯度稀释至 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} ,分别滴加菌液于相应编号的平板表面,每个梯度做 3 个重复,用涂布器涂布均匀,20~30 min 后倒置,并放于 28 °C 恒温箱中培养。每天观察平板,记录菌落出现的日期、菌落解磷能力出现日期、菌落直径、解磷圈出现日期及直径大小。培养 7 d 后,得到解磷能力比较强的菌株进行纯化培养,将纯化培养几代的菌株进行菌种保存。

1.3.2 复筛 采用液体发酵培养法,将解磷微生物培养在难溶性磷液体培养基上,按照配方配制液体培养基进行高压灭菌,在超净工作台上,按照无菌接种法,接种纯化后的解磷真菌于发酵液,置于摇床中,30 °C, 120 r/min 培养 7 d, 每天观察发酵液的变化,并记录菌丝球的出现日期、菌丝球颜色,目测其大小。发酵结束后,进行发酵液有效磷测定。

1.3.3 生物学测定 本次试验采用察氏培养基进行试验,其配方如下:碳源 30 g, NaNO_3 2 g, K_2HPO_4 1 g, KCl 0.5 g,

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1 000 mL, 自然 pH 值。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选

将菌悬液通过涂布平板法进行培养后得到了 20 株解磷效果较好的解磷菌株。通过对菌种初筛时得到的 20 株菌株的培养及解磷能力的测定,得到了 1 株高效解磷菌 F1312。高效解磷菌 F1312 解磷能力达 318.26 mg/L。

2.2 菌种形态观察及分类地位初步确定

培养皿中的菌株呈放射状,生长初期为白色,稳定后为青色。液体培养为白色菌丝球,球状,直径 3~5 mm,发酵液为乳白色,黏稠,拉丝。由显微镜观察后,发现其菌丝直径为 1 μm ,孢子呈椭圆形,直径为 1~1.2 μm ,长为 2~2.3 μm 。初步确定为放线菌。

2.3 菌株解磷生物学特性研究

2.3.1 不同碳源对菌株生长的影响 碳源明显影响菌株 F1312 的生长(图 1)。当以麦芽糖为唯一碳源时,其生长情况最好,一直呈快速生长状态。其次为葡萄糖,前 3 d 呈现出快速生长的趋势,之后趋于平缓,且前 5 d 内其菌落直径大于麦芽糖。当以蔗糖为唯一碳源时,前 4 d 呈现出快速生长的趋势,之后几天趋于平缓。以乳糖为唯一碳源时,前 5 d 虽然也表现出较快的生长趋势,但相对于其他 3 种碳源,其生长一直缓慢,菌落直径最小。培养 7 d 时,当碳源为麦芽糖时菌落直径最大,达到 38.0 mm,菌种长势相对最好,葡萄糖和蔗糖相近,分别为 35.0 mm 和 34.0 mm,乳糖相对生长最差,为 31.0 mm。

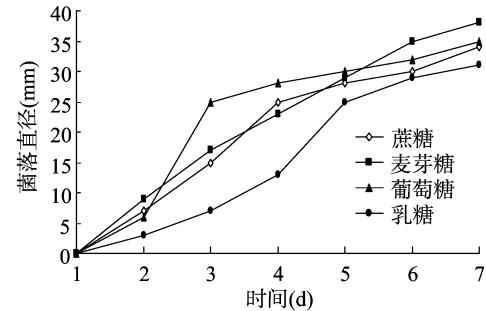


图 1 不同碳源对菌株的影响

2.3.2 不同氮源对菌落生长的影响 不同氮源明显影响菌株 F1312 的生长(图 2)。当以酵母浸膏粉为唯一氮源时,其生长最为迅速。其次为硝酸钾,然后是硝酸钠,最差的为亚硝酸钠。前 4 d 酵母浸膏粉培养基上的 F1312 菌株和硝酸钾培养基上 F1312 菌株生长情况大体相同,之后 3 d 酵母浸膏粉上的 F1312 菌株生长迅速。培养 7 d 时,以酵母浸膏粉为唯一碳源的培养基上的菌株菌落直径最大,达到了 48.0 mm。以硝酸钾为唯一氮源时,菌落直径次之,为 45.0 mm。当以硝酸钠为唯一氮源时菌落直径再次之,为 3.6 mm。当以亚硝酸钠为唯一氮源时菌落直径最小,菌株相对生长最差,其菌落直径仅为 2.7 mm。

2.3.3 不同温度对菌落生长的影响 温度对解磷菌的生长影响较大(图 3)。在不同温度下,菌株 F1312 一直呈现出快速增长的趋势。当温度为 30 °C 时菌落直径最大,达到

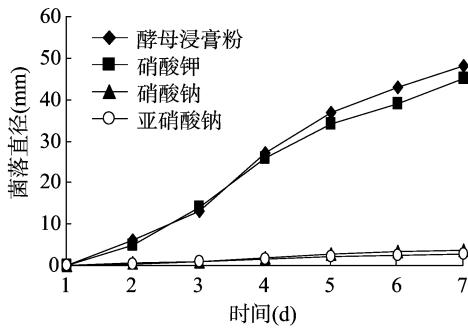


图2 不同氮源对菌株生长的影响

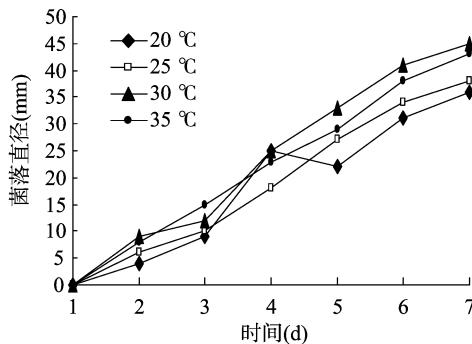


图3 不同温度对菌落生长的影响

45.0 mm。当温度为20 °C时菌落直径最小,为36.0 mm。25 °C和35 °C菌落直径相近,分别为38.0 mm和43.0 mm。

2.3.4 不同pH值对菌落生长的影响 pH值对菌株F1312生长的影响并不是很大(图4)。培养7 d时,菌落直径最大的是pH值=7的培养基上的菌落,其直径为48.0 mm;菌落直径最小的是pH值=9的培养基上的菌落,其稳定状态时的菌落直径为42.0 mm。pH值=6的培养基为第二,其菌落直径为46.0 mm。pH值=8的培养基为第三,其菌落直径为44.0 cm。这说明菌株F1312生长环境偏酸性。当pH值在6~7之间时,菌落直径的趋势是随着其增大而增大,当pH值在7~9之间时,菌落直径随着其增大而减小。所以当pH值超过7时,pH值对该菌种的生长具有明显的抑制作用。

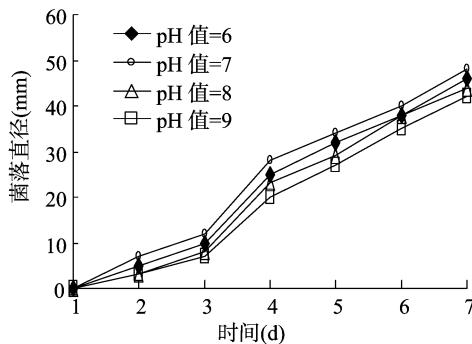


图4 不同pH值对菌株生长的影响

2.4 解磷菌株F1312发酵条件优化

菌株F1312不同试验组发酵液有效磷含量差异较大(表2),通过不同发酵条件组合发现,该菌株发酵的最适条件为:温度30 °C,pH值=7,碳氮比20:1,转速150 r/min,此条件下该菌株解磷能力最强。

表2 菌株F1312发酵条件正交试验结果

序号	温度(°C)	pH值	碳氮比	转速(r/min)	解磷量(mg/L)
1	25	7	30:1	100	195.56
2	25	8	20:1	150	265.37
3	25	9	5:1	100→150→100	132.22
4	30	7	20:1	100→150→100	310.29
5	30	8	5:1	100	295.58
6	30	9	30:1	150	271.88
7	35	7	5:1	150	202.33
8	35	8	30:1	100→150→100	146.26
9	35	9	20:1	100	139.27
K_1	593.15	708.18	613.70	630.41	
K_2	877.75	707.21	714.93	739.58	
K_3	487.86	543.37	631.13	588.77	
k_1	197.72	236.06	204.57	210.14	
k_2	292.58	235.74	238.31	246.53	
k_3	162.62	181.12	210.38	196.26	

3 结论

(1)高效解磷菌F1312为放线菌,其解磷量为318.26 mg/L。(2)F1312生长的最适pH值=7,最适温度为30 °C,最适碳源为麦芽糖,不同碳源中其长势顺序是:麦芽糖>葡萄糖>蔗糖>乳糖;最适氮源为酵母浸膏粉,不同氮源中长势顺序是:酵母浸膏粉>硝酸钾>硝酸钠>亚硝酸钠。(3)该菌株最适发酵条件为:pH值=7,温度30 °C,碳氮比20:1,转速150 r/min。

参考文献:

- [1] 来璐,郝明德,彭令发. 土壤磷素研究进展[J]. 水土保持研究,2003,10(1):65~67.
- [2] 刘建玲,张凤华. 土壤磷素化学行为及影响因素研究进展[J]. 河北农业大学学报,2000,23(3):36~45.
- [3] 刘江,谷洁,高华,等. 秦岭山区无机磷细菌筛选及其Biolog和分子生物学鉴定[J]. 干旱地区农业研究,2012,30(1):184~189.
- [4] Narsian V, Patel H H. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry,2000,32(4):559~565.
- [5] 胡春明,姚波,席北斗,等. 一株耐高温无机磷降解菌解磷能力的研究[J]. 东北农业大学学报,2010,41(1):47~51.
- [6] 林启美,王华,赵蓉,等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. 微生物学通报,2001,28(2):26~30.
- [7] 刘长霞,谭天伟,翟洪杰. 盐碱条件对真菌解磷能力的影响[J]. 微生物学通报,2003,30(5):69~72.
- [8] 钟传青,黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化[J]. 土壤学报,2005,42(2):286~294.
- [9] 王莉晶,高晓蓉,吕军,等. 解磷真菌C2'的分离鉴定及其在土壤中实际解磷效果的研究[J]. 土壤通报,2009,40(4):771~775.
- [10] 赵小蓉,林启美,李保国. 溶磷菌对4种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究[J]. 微生物学报,2002,42(2):236~241.
- [11] 范丙全,金继运,葛诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究[J]. 中国农业科学,2002,35(5):525~530.