

伍善东,刘冬华,郭照辉,等. 1 株高效解无机磷细菌 JP-7 的分离、鉴定及溶磷能力分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):374-376.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.116

1 株高效解无机磷细菌 JP-7 的 分离、鉴定及溶磷能力分析

伍善东,刘冬华,郭照辉,程伟,单世平

(湖南省微生物研究院,湖南长沙 410009)

摘要:从土壤中分离高效解无机磷细菌。对分离到的菌株,通过平板法进行初筛,根据透明圈直径和菌落直径比值大小初步确定菌株解无机磷的能力,进一步通过液体摇瓶培养,利用钼锑抗比色法测定发酵上清液中有效磷含量。通过形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 序列分析等一系列试验对菌株进行鉴定。结果表明,共分离到 4 株具有解无机磷能力的细菌,其中 JP-7 解无机磷能力最强, D/d 比值为 2.15,发酵上清液中有效磷含量为 105.69 mg/L,对照上清液中有效磷含量为 0.32 mg/L,增加 329.28 倍。该菌株初步鉴定为枯草芽孢杆菌。

关键词:解无机磷细菌;钼锑抗比色法;有效磷;枯草芽孢杆菌

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)12-0374-02

磷是植物生长所必需的重要营养元素之一。我国 74% 的耕地土壤缺磷,土壤中 95% 以上的磷为无效磷^[1],植物很难直接吸收利用。解磷菌能使土壤中难溶性或不溶性的磷转化成易于被植物吸收利用的磷,从而提高土壤供磷水平^[2]。解磷微生物不仅能改善植物磷素营养,还能促进土壤中有益微生物的代谢活动,显著改善植物根部营养,提高作物的增产效果^[3]。具有解磷能力的微生物包括细菌、真菌和放线菌。解磷微生物的研究、应用在国内多有报道^[4]。充分利用土壤中的磷资源,降低化肥过量施用造成环境的污染,有利于农业生产的可持续性发展。

1 材料与方法

1.1 材料

土壤采集于湘潭市郊区水稻田和长沙市郊区油菜田。并采用 5 点取样法将土壤装入无菌保鲜袋中,做好标记,封口^[5]。

培养基:PKO 培养基[包括:5.0 g 磷酸三钙,10.0 g 蔗糖,0.5 g (NH₄)₂SO₄,0.5 g 酵母粉,0.2 g 氯化钠,0.1 g 七水硫酸镁,0.2 g 氯化钾,3.0 mL 1% 硫酸锰,3.0 mL 1% 硫酸亚铁,18.0 g 琼脂,1 000.0 mL 去离子水;pH 值为 7.0]、牛肉膏蛋白胨培养基[包括:3.0 g 牛肉膏,10.0 g 蛋白胨,5.0 g 氯化钠,18.0 g 琼脂,1 000.0 mL 去离子水,pH 值为 7.2]。

1.2 方法

1.2.1 解磷菌株的分离

称取质量为 10.0 g 的土壤直接放

入盛有 90.0 mL 无菌水(带玻璃珠)的三角瓶内,振荡 10 min,静置 5 min 后吸取上清液依梯度稀释至 10⁻⁷。从 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 各吸取稀释液 1 mL,分别加入到 PKO 固体培养基上,用涂布棒涂抹均匀后培养皿倒置放入 30 ℃ 的恒温箱中培养 5~7 d。每个稀释度 3 次重复。选择有较大清晰透明圈的菌株在 PKO 固体培养基上进行划线分离纯化,挑取单菌落移接到试管斜面上,4 ℃ 保存。

1.2.2 透明圈法定性测定 将分离获得的纯菌株点接种于 PKO 培养基上,置于 30 ℃ 培养箱中培养 5~7 d,观察有无透明圈,并根据透明圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)大小初步确定菌株的解磷能力^[6]。

1.2.3 液体培养基中有效磷含量的测定 将斜面保存的菌株活化后接种于装有 100 mL PKO 液体培养基的三角摇瓶中,以不接菌的 PKO 培养基作对照,每个 3 次重复,30 ℃ 恒温,180 r/min 摇床振荡培养 7 d。将发酵液在 4 ℃,以 5 000 r/min 的转速离心 15 min,收集上清液。取 1 mL 上清液稀释适当倍数后用钼锑抗比色法测磷含量^[7]。

1.2.4 解磷菌株的鉴定 形态学鉴定:将纯化后的菌株在牛肉膏蛋白胨培养基上培养,观察细菌菌落生长特征,注意其形状、大小、颜色、透明度、边缘特征、隆起程度等,并作记录。用接种环挑取纯化后的菌株进行革兰氏染色、镜检。

生理生化鉴定:生理生化试验按照东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[8]进行。

解无机磷菌株的 16S rDNA 序列分析:解磷菌株过夜培养后,提取其总 DNA,以总 DNA 为模板,PCR 扩增其 16S rDNA 片断^[9]。PCR 引物序列如下:(F) 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';(R) 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3';PCR 反应体系:10 × buffer 5 μL,dNTPs 2 μL,PCR 引物各 1 μL,模板 DNA 0.5 μL,Taq DNA 聚合酶 0.8 μL,用去离子水定容至 50 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 45 s,58 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。利用 PCR 产物回收试剂盒回收 PCR 产物,并通过

收稿日期:2014-12-25
基金项目:湖南省自然科学基金(编号:13JJ2035);湖南省长沙市科技计划项目(编号:K0802013-31)。

作者简介:伍善东(1978—),男,湖南绥宁人,工程师,主要从事植物保护研究。E-mail:1059995305@qq.com。

通信作者:单世平(1978—),男,山东菏泽人,博士,副研究员,主要从事农田土壤重金属污染防治、土壤肥料发酵工艺等方面的研究。E-mail:ssp312@hotmail.com。

TA 克隆将目的片断插入到 pMD-18T 载体后,送样至上海生工有限责任公司进行序列测定。测序后的序列与 GenBank 数据库中所收录的序列进行同源比对,并利用 MEGA 5.1 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 解无机磷菌的分离

从土壤样品中分离到 4 株在 PKO 培养基平皿中具有透明圈的细菌菌株,将菌株在 PKO 培养基上划线纯化后,挑取单菌落移接到试管斜面上,4℃保存。

2.2 透明圈法定性测定结果

菌株 JP-7 在 PKO 培养基平皿的透明圈直径最大,为 18.5 mm,菌落直径为 8.6 mm, D/d 比值为 2.15。各菌株的 D/d 比值从大至小依次为:JP-7 > JP-9 > JP-3 > JP-2 (表 1)。

表 1 透明圈法定测定各菌株的解磷能力

菌株名称	透明圈直径 D (mm)	菌落直径 d (mm)	D/d
JP-2	10.20	7.90	1.29
JP-3	13.20	9.40	1.40
JP-7	18.50	8.60	2.15
JP-9	15.40	9.10	1.69

2.3 液体培养基中有效磷含量的测定

将 4 株细菌分别接入 PKO 液体培养基三角瓶中,摇床振荡培养 7 d,采用钼锑抗比色法测上清液中的有效磷含量。结果表明,4 株细菌对磷酸三钙均有一定的溶解作用,但各菌株的溶解能力不同,上清液中有效磷含量在 20.52 ~ 105.69 mg/L 范围之内,与不接菌的对照相比,增量在 20.20 ~ 105.37 mg/L 之间,其中,以 JP-7 菌株的发酵上清液中有有效磷增加量最多,为 105.37 mg/L,增幅为 329.28 倍(表 2)。JP-2 的 D/d 比值为 1.29,其发酵上清液中有有效磷含量为 31.45 mg/L,而 JP-3 的 D/d 比值为 1.40,其发酵上清液中有有效磷含量仅为 20.52 mg/L。就 JP-2、JP-9、JP-7 而言,透明圈直径和菌落直径比值大的菌株,其发酵上清液中有

效磷含量也较高,因而可知, D/d 比值大小与发酵上清液中有有效磷含量高低不存在线性关系。由于菌株 JP-7 解无机磷能力明显优于其他菌株,故选择其进行下一步试验。

表 2 4 株细菌分解无机磷能力的定量测定

菌株名称	上清液磷含量 (mg/L)	增加量 (mg/L)	增加倍数
CK	0.32		
JP-2	31.45	31.13	97.28
JP-3	20.52	20.20	63.13
JP-7	105.69	105.37	329.28
JP-9	50.78	50.46	157.69

2.4 解无机磷菌株的鉴定

2.4.1 形态学鉴定 将 JP-7 划线于牛肉膏蛋白胨培养基上,28℃培养 48 h,对菌落特征进行观察,该菌菌落圆形或椭圆形,白色,表面干燥不光滑、无光泽、不透明,边缘不整齐。显微镜下观察:菌体呈杆状,(0.6 ~ 1.5) $\mu\text{m} \times (1.5 \sim 3.5) \mu\text{m}$ 。革兰氏染色阳性。

2.4.2 生理生化鉴定 菌株 JP-7 生理生化实验按照东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[8] 进行。V.P 试验测定阳性,接触酶试验阳性,木糖产酸阳性,葡萄糖产酸阳性,丙酸盐利用阴性,柠檬酸盐利用阳性,明胶水解阳性,淀粉水解阳性,木糖产气阴性,葡萄糖产气阴性,吡啶形成阳性,苯丙氨酸脱氨酶试验阴性,5% 氯化钠生长阳性,7% 氯化钠生长阳性,菌膜形成试验阳性。

2.4.3 解无机磷菌株的 16S rDNA 序列分析 利用解无机磷细菌 JP-7 的 16S rDNA 扩增序列在 GenBank 数据库进行比对,其与枯草芽孢杆菌同源率为 99%,用 MEGA 5.1 软件建立系统发育树(图 1)。同时,结合解无机磷细菌 JP-7 的菌体、菌落形态特征及生理生化特性,初步确定该菌株为枯草芽孢杆菌。

3 结论与讨论

解磷微生物的种类繁多,解磷机制不尽相同且很复杂,深入研究解磷菌施于土壤后的活动规律和消长动态以及解磷作

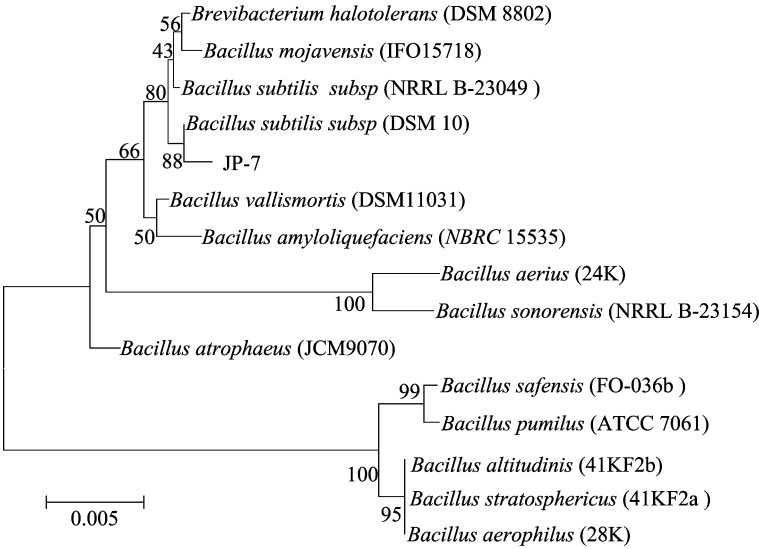


图 1 以 16S rDNA 序列为基础的 JP-7 菌株的系统发育树

王纪辉,王修俊,杨志波,等. 1 株降解秸秆高温菌的分离、鉴定及降解能力[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):376-378.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.12.117

1 株降解秸秆高温菌的分离、鉴定及降解能力

王纪辉,王修俊,杨志波,尹 爽,刘佳慧,田 多,曲 源

(贵州大学酿酒与食品工程学院/贵州大学发酵工程与生物制药省级重点实验室,贵州贵阳 550025)

摘要:为分离得到高温高效降解菌株,促进作物秸秆快速腐解还田,解决秸秆资源的高效利用、培肥土壤和保护生态环境问题,从水稻秸秆中筛选分离出 1 株高温菌,具有降解农作物秸秆的能力。该菌株经鉴定为嗜热蹻节菌,其最佳降解条件为:发酵时间 15 d,发酵温度为 55 ℃,高温菌株用量 2 mL。在上述条件下,纤维素含量由初始的 33.13% 下降到 25.92%,木质素含量从最初的 12.65% 下降到 8.57%。

关键词:秸秆;高温菌;分离;鉴定;降解能力

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)12-0376-03

我国是农业大国,每年将产生大量的农作物秸秆,然而大量的作物秸秆并没有得到有效利用,大部分被露天焚烧或者随意丢弃,导致资源的大量浪费,并且加剧环境污染,阻碍交通^[1-5]。目前国内外作物秸秆处理实践表明,高温发酵是实现秸秆再利用的有效途径之一。由于传统的作物秸秆处理方法存在发酵时间长、腐殖质转化不完全等问题,因此,如何解决这些问题,缩短发酵周期、提高秸秆降解速率一直是国内外学者研究的一个重要课题^[6-7]。作物秸秆中难降解有机物的存在是导致上述问题的主要原因,而发酵高温期是有机大分子降解的主要阶段,但微生物在这个阶段受高温因素的影响,其种群数量和活性会普遍降低,由此限制了有机物的快速分

解^[8]。目前,针对促进秸秆快速降解的研究主要集中在工艺优化和筛选高温菌方面,与常温菌相比,高温菌具有代谢快、活性高、酶的热稳定性好、有机物降解速率快、营造高温条件杀死病原菌等特点^[9]。所以,在作物秸秆中接种高温菌进行发酵,可增加高温期微生物的数量,促进难降解有机物的快速转化,从而提高作物秸秆的降解速度^[10]。因此,本试验从表面长有菌丝的水稻秸秆上筛选分离出 1 株高温菌株,并将该菌接种到秸秆上对其降解秸秆能力进行研究,旨在为促进秸秆的快速降解提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻秸秆采自贵州省贵阳市郊农田。

主要试剂:重铬酸钾、硫酸亚铁、二氧化硅、邻啡罗啉、95% 乙醇、乙二胺四乙酸二钠、硼酸钠、十二烷基硫酸钠、无水磷酸氢二钠、乙二醇乙醚、丙酮等。

试验仪器:生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、净化工作台(上海索谱仪器有限公司)、恒温恒湿箱

收稿日期:2015-04-23

基金项目:贵州省社会发展科技攻关项目(编号:黔科合 SY[2010]3041)。

作者简介:王纪辉(1988—),男,河南周口人,硕士研究生,研究方向为食品发酵。E-mail:shikewangjihui@163.com。

通信作者:王修俊,博士,教授,主要从事食品安全及发酵工艺方面的研究。E-mail:wangxiujun678@sohu.com。

用的发挥条件,可以更好地挖掘微生物的解磷潜能^[10]。本研究通过透明圈法初步分离出具有解无机磷能力的细菌 4 株,菌株在培养基上能够形成良好的透明圈,说明这些菌株可以分泌一些酸性物质,并向培养基中扩散,使菌落周围的磷酸盐(磷酸三钙)溶解,即这些菌株具有溶磷性^[11],采用钼锑抗比色法测定上清液中的有效磷含量,确定菌株 JP-7 具有较强的解磷能力,但要想进一步应用到实际生产中,还必须加强对菌株生长繁殖特点的研究。

参考文献:

- [1] 吴 平,印莉萍,张立平. 植物营养分子生理学[M]. 北京:科学出版社,2001:103-104.
- [2] 戴沈艳,贺云举,申卫收,等. 一株高效解磷细菌的紫外诱变选育及其在红壤稻田施用效果[J]. 生态环境学报,2010,19(7):1646-1652.
- [3] 江丽华,刘兆辉,石 璟,等. 真菌 F2 的解磷能力及其生长动态

- 研究[J]. 中国农学通报,2009,25(1):42-46.
- [4] 唐 勇,陆 玲,杨启银,等. 解磷微生物及其应用的研究进展[J]. 天津农业科学,2001,7(2):1-5.
- [5] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫,等. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学通报,2001,28(1):1-4.
- [6] 朱 颖,姚 拓,李玉娥,等. 红三叶根际溶磷菌分离及其溶磷机制初探[J]. 草地学报,2009,17(2):259-263.
- [7] 张祥胜. 发酵液有效磷含量测定方法研究[J]. 湖州职业技术学院学报,2008,6(3):1-3.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [9] 别小妹,陆兆新,房耀维,等. 利用 16S rDNA 序列分析鉴定一株产抗菌物质的微生物菌株[J]. 食品科学,2006,27(11):466-470.
- [10] 韩玉竹,赵建军,曾 兵,等. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定[J]. 草地学报,2011,19(5):766-770.
- [11] 李凤霞,梁锦绣,周 涛. 宁夏产枸杞根际溶磷菌分离及溶磷能力分析[J]. 植物资源与环境学报,2006,15(2):29-32.