吕　睿,贾凤安,刘　晨,等. 无机磷降解菌株的分离、鉴定及解磷能力[J]. 江苏农业科学,2017,45(20):295 – 298.
doi:10.15889/j.issn.1002 – 1302.2017.20.073

无机磷降解菌株的分离、鉴定及解磷能力

吕　睿, 贾凤安, 刘　晨, 胡　婷, 甄丽莎
(陕西省微生物研究所,陕西西安 710043)

摘要:为了开发高效微生物解磷肥,利用解磷菌选择培养基,从陕西省西安市周至县猕猴桃园农田土壤中分离出具有降解无机磷能力的菌株共计 9 株,通过纯化培养,筛选出 1 株高效无机磷降解菌 JWP3。利用 16S rDNA 基因序列分析方法对该菌株的分类信息进行鉴定,鉴定结果表明该菌株为胶质芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)。并通过试验确定了该菌株的最适培养条件:初始接种量 4%,摇床转速 200 r/min,培养温度 30 ℃,初始 pH 值为 7。试验结果可为无机磷降解菌 JWP3 的大规模工业化生产提供数据支持。

关键词:无机磷降解菌;筛选;鉴定;解磷能力;最适培养条件
中图分类号: S182　　**文献标志码:** A　　**文章编号:**1002 – 1302(2017)20 – 0295 – 04

磷元素是植物生长所必需的三大营养要素之一,我国有 75% 的土壤缺磷[1],特别是北方石灰性土壤,虽然全磷含量很高,均在 0.57 ~ 0.79 g/kg 之间,但由于土壤中存在大量的游离碳酸钙,大部分磷形成难溶性的磷酸钙盐,能被作物吸收利用的有效磷含量很低[2],土壤中 95% 的磷为无效形式[3],大部分与土壤中 Ca^{2+}、Fe^{2+}、Fe^{3+}、Al^{3+} 结合形成难溶性磷酸盐。因此,如何开发和有效利用这部分被土壤固定的磷是目前我国农业生产中急需要解决的问题。

而土壤中存在着一些微生物能够将难溶性的磷酸盐转化为可利用形态,这些微生物称为解磷微生物(phosphate solubilizing micro – organisms,PSM),能够将难溶性的磷酸盐如矿磷粉转化为水溶性磷,提高土壤中的可溶性磷含量,从而改善植物磷素营养,提高作物产量[4-6]。因此,对解磷微生物菌剂及其应用的研究,成为了土壤微生物修复研究的热点,对提高土壤肥力和促进农作物增产具有重要的意义。

由于不同种类的解磷菌或菌株之间的解磷能力和接种效果差异悬殊,所以高效解磷菌株的筛选显得尤为重要[7]。本试验以磷酸钙为唯一磷源,通过选择性培养,从陕西省西安市周至县猕猴桃园大田土壤中分离筛选出 9 株解磷菌株,并通过分离、纯化、复筛,得到 1 株解磷能力较强的细菌 JWP3,研究该菌株的生理生化特征及对磷矿石的降解特性,确定菌株的最适接种量,最适 pH 值、最适生长温度及摇床转速对解磷能力的影响,确定该菌株的生长情况及解磷能力,为开发新的成本低、效果好且不污染环境的解磷菌肥提供科学依据,对发展绿色农业具有十分重要的意义。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　土样　采集陕西省西安市周至县猕猴桃园土壤,土样采集方法为五点采样法,去除表层土壤,用土钻取深度为 0 ~ 20 cm 的土壤,将 5 个不同点的土样混合为 1 份,装入无菌样品采集袋,标签注明采样信息,放入 4 ℃冰箱保存。

1.1.2　培养基　无机磷液体培养基:蔗糖 10.0 g,$(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 g,NaCl 0.3 g,KCl 0.3 g,$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g,$MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.03 g,$Ca_3(PO_4)_2$ 5.0 g,,蒸馏水 1.0 L,pH 值 7.2 ~ 7.5,121 ℃灭菌 20 min。

无机磷固体培养基:无机磷液体培养基中加入 20 g 琼脂。

LB 液体培养基[8]:蛋白胨 10 g,酵母粉 5 g,氯化钠 5 g,加蒸馏水至 1 L,pH 值 7.0。

1.2　方法

1.2.1　解磷菌的富集　取 1 只 250 mL 锥形瓶,加入无机磷液体培养基 100 mL,向锥形瓶中加入 1 g 土壤样品,摇床培养 2 d(温度 30 ℃,转速 180 r/min),吸取锥形瓶底部菌液进行转接,富集解磷菌,每次转接前将菌液涂布到平板上计数。重复上述步骤,对不同样品进行处理。

1.2.2　解磷菌的初筛　将富集培养基中的菌种转接到含磷酸钙无机盐培养基的平板上,置于 30 ℃恒温培养箱中,出现菌落后,挑取单菌落转接至新的固体培养基上,重复上述操作 3 次,将单菌落放入冰箱保存备用。

1.2.3　解磷菌的复筛　将初筛出的菌株转接到装有 50 mL 磷酸钙液体培养基中,摇床培养 5 d,涂布,记录菌数,同时检测磷酸钙的降解,将菌液以 8 000 r/min 离心 5 min,取上清 10 mL,加 5 mL 钼锑抗显色剂,加蒸馏水定容至 50 mL,以不接菌处理为对照,用分光光度计测量吸光度,计算磷含量,筛选出 1 株生长旺盛、降解能力强的菌株。

1.2.4　菌株形态学特征　将分离纯化得到的菌株在固体平板上进行划线培养,在温度为 30 ℃的条件下培养 2 d,观察菌

收稿日期:2016 – 08 – 22
基金项目:陕西省科学院青年专项基金(编号:2015K – 20);陕西省科学院应用基础项目(编号:2014K – 13);西安市科技局农业技术研发项目[编号:NC1404 (2)]。
作者简介:吕　睿(1987—),男,硕士,研究实习员,主要从事微生物肥料的开发和利用研究。Tel:(029)85350847;E – mail:lv1987rui@163.com。
通信作者:甄丽莎,博士,助理研究员,主要从事土壤微生物的开发和利用研究。Tel:(029)85350847;E – mail:zhenlisha2002@163.com。

株生长状况及菌落特征。

1.2.5　菌株 16S rDNA 序列分析及比对　选用细菌 16S rDNA 通用引物 27F(5′ – AGAGTTTGATCCTGGCTCAG – 3′)和 1492R(5′ – GGTTACCTTGTTACGACTT – 3′)建立 PCR 扩增体系进行扩增。PCR 反应体系(50 μL):5 × One *Taq* Standard Reaction Buffer 10 μL, 10 mmol/L dNTPs 1 μL, 10 μmol/L Forward Primer 1 μL, 10 μmol/L Reverse Primer 1 μL, One *Taq* DNA Polymerase 1 μL, Template DNA 2.0 μL, Nuclease – Free water 34 μL。扩增程序:94 ℃预变性 10 min;94 ℃变性 30 s,65 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃延伸 10 min。产物经纯化后测定基因序列,利用 Blast 将菌株的基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行比较,选取相似性较高的模式菌株序列,用 MEGA 5.1 中 Neighbor – Joining 法比较同源性,构建系统发育树。

1.2.6　菌株解磷能力测定　配制解磷培养基(不加磷源)按 50 mL 每瓶分装于 250 mL 锥形瓶中,分别加入 0.1 g 准确称取的磷酸钙,在 121 ℃条件下灭菌 20 min,每个锥形瓶接入 2%待测菌悬液,28 ℃ 180 r/min 条件下摇床培养 5 d,菌液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清 10 mL,加 5 mL 钼锑抗显色剂,加水定容至 50 mL,利用分光光度计测定并计算上清液中磷含量。

1.2.6.1　最适初始接种量测定　配制液体培养基,按 1%、2%、3%、4%和 5%等 5 个接种量接入到解磷培养基中,在 28 ℃条件下摇瓶培养 5 d,菌液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清 10 mL,加 5 mL 钼锑抗显色剂,加水定容至 50 mL,利用分光光度计测定并计算上清液中磷含量。

1.2.6.2　最适初始 pH 值测定　配制磷酸钙液体培养基,分组调节 pH 值为 5、6、7、8、9,按 4%接种量接种,在 28 ℃条件下摇瓶培养 5 d,菌液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清 10 mL,加 5 mL 钼锑抗显色剂,加水定容至 50 mL,利用分光光度计测定并计算上清液中磷含量。

1.2.6.3　最适生长温度测定　按 4%接种量将菌株接入培养液中,调节 pH 值为 7,将菌种接于磷酸钙液体培养基中,分别置于温度为 24、26、28、30、32 ℃的摇床中培养 5 d,菌液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清 10 mL,加 5 mL 钼锑抗显色剂,加水定容至 50 mL,利用分光光度计测定并计算上清液中磷含量。

1.2.6.4　最适生长转速测定　按 4%接种量将菌株接入培养液中,调节 pH 值为 7,温度设置为 30 ℃,调节摇床转速分别为 140、180、200、220 r/min,培养 5 d 后,菌液 8 000 r/min 离心 10 min,取上清 10 mL,加 5 mL 钼锑抗显色剂,加水定容至 50 mL,利用分光光度计测定并计算上清液中磷含量。

1.2.7　数据处理　数据采用 Excel 2010 和 SPSS 19 统计软件进行方差分析和多重比较。

2　结果与分析

2.1　解磷菌的筛选

对土壤样品进行涂布处理,初步得到菌株 21 株,经复筛,得到具有高效解磷能力的菌株 9 株,通过钼蓝比色法测量解磷量。由表 1 可知,9 株解磷菌的解磷能力相比于对照都有明显增加。其中,JWP 2 解磷效果最弱,菌液中速效磷含量为 10.47 mg/L,比空白对照增加了 3.72 mg/L,而菌株 JWP3 培养液中速效磷含量最高,达到 73.22 mg/L,比空白对照增加了 66.47 mg/L,其解磷能力最强,本试验以 JWP3 菌株为研究对象,对其菌落特征和解磷特性做进一步研究。

表 1　初筛菌株菌落平板计数结果及解磷能力测定

菌株编号	菌落数 ($\times 10^5$ CFU/mL)	速效磷含量 (mg/L)	增加量 (mg/L)
CK	0.0	6.75	
JWP1	2.0	21.69	14.94
JWP2	1.1	10.47	3.72
JWP3	16.0	73.22	66.47
JWP4	7.8	49.38	42.63
JWP5	12.6	63.87	57.12
JWP6	6.9	30.66	23.91
JWP7	2.1	21.69	14.94
JWP8	7.0	42.39	35.64
JWP9	6.2	49.63	42.88

2.2　菌落形态特征

采用平板划线法将 JWP3 菌株进行纯化,并涂布至固体培养基上,培养 2 d 后,观察菌株形态。如图 1 所示,菌株单菌落呈水滴状,菌落无色透明,边缘光滑,表面湿润且黏稠,菌落直径约为 0.5 cm。

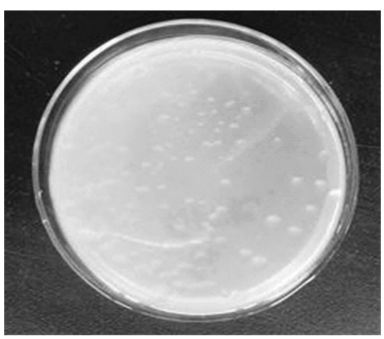


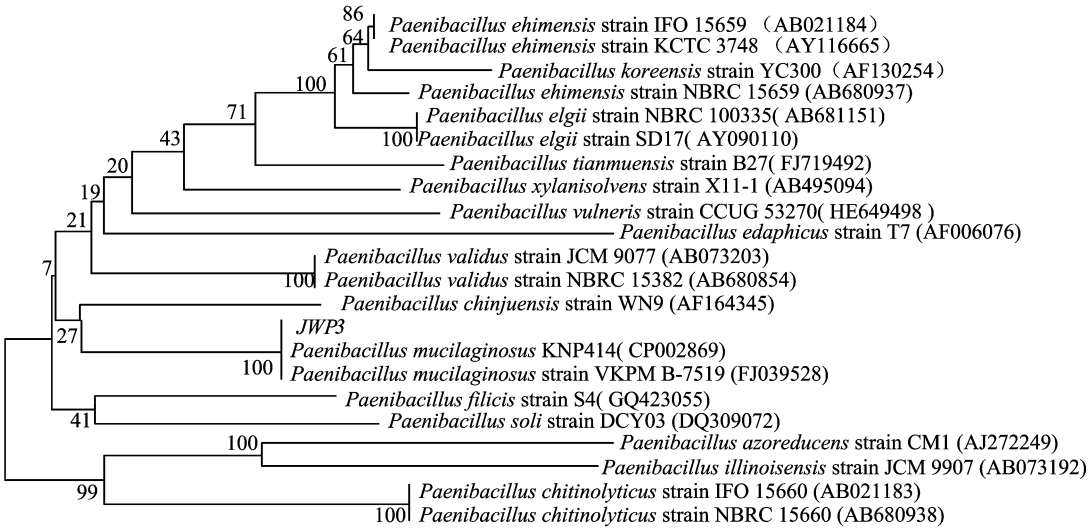
图1　菌株 JWP3 的单菌落形态

2.3　16S rDNA 测序分析

菌株 JWP3 经 16S rDNA 测序获得 1 400 bp 的基因片段,将序列信息提交到 GenBank 数据库中,利用 Blast 将菌株的基因序列进行相似性比较,结果表明,菌株 JWP3 与胶质芽孢杆菌属同源性很高,从 16S rDNA 序列相似性比较结果看,菌株 JWP3 与胶质芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)相似性达到 100%,选取 21 株同源性较高的胶质芽孢杆菌菌株序列与待测菌株序列构建系统发育树(图 2),从系统发育树可以看出,菌株 JWP3 与胶质芽孢杆菌相似性达到 100%且处于同一分支,距离最近,鉴定菌株 JWP3 为胶质芽孢杆菌。

2.4　菌株解磷能力研究

2.4.1　最适初始接种量　由图 3 可以看出,从接种量 1%开始,随接种量的增加,速效磷含量呈逐渐上升的趋势,当接种量为 4%时,菌液中速效磷含量达到最大(96.56 mg/L),比接种量为 3.0%时高了 17.6 mg/L,有显著性差异,而当接种量达到 5%时,解磷量为 96.55 mg/L,与 4%时无显著性差异,从经济角度考虑,选取 4%为最适接种量。



标尺为0.005；分支点为自聚值；括号中为菌株序列号

图2　菌株 JWP3 的系统发育树

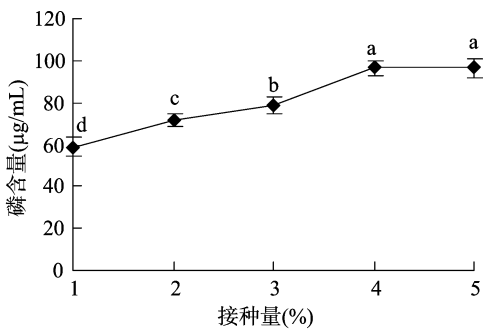


图3　菌株 JWP3 最适接种量

2.4.2　最适初始 pH 值　不同 pH 值对菌株生长及解磷能力有显著影响，由图 4 可看出，当 pH 值达到 7 时解磷量达到最大，菌液中的速效磷含量达到 97.28 mg/L，与其他 pH 值时有显著差异，当 pH 值达到 6 时解磷能力为 74.90 mg/L，比 pH 值 9 时高了 2.5 mg/L，而比 pH 值 8 时低了 13 mg/L，有显著差异。因此确定，菌株 JWP3 的最适生长 pH 值为 7，且菌株适合生长于中性或偏碱性的环境中，这对于菌株的大规模生产有重要指导意义。

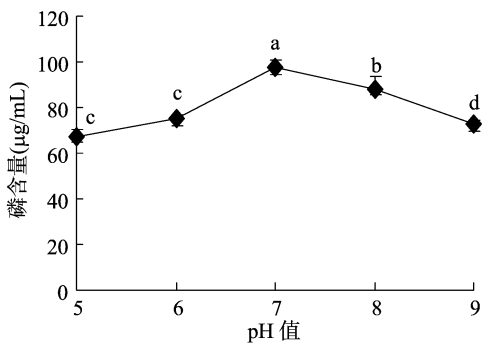


图4　菌株 JWP3 最适培养 pH 值

2.4.3　最适培养温度　温度的变化对菌株的降解作用有显著影响，由图 5 可看出，随着温度的升高，菌株解磷能力逐渐增强，当温度达到 30 ℃时，解磷量达到最高，菌液中的速效磷含量达到 112.6 mg/L，比 28 ℃时增加了 14.6 mg/L，而温度为 32 ℃时，解磷量为 89.05 mg/L，与 28 ℃时相比，显著降低，可能是温度升高导致菌株生长受到抑制，使解磷能力降低，因此确定菌株 JWP3 的最适生长温度为 30 ℃。

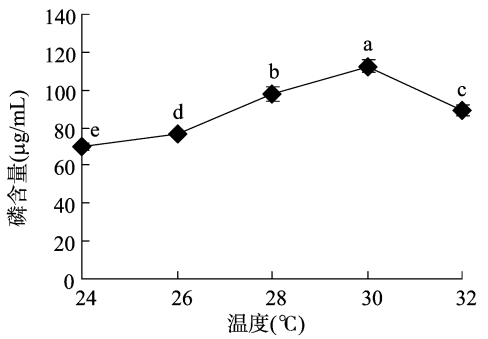


图5　菌株 JWP3 最适生长温度

2.4.4　最适摇床转速　由图 6 可看出，不同摇床转速对菌株解磷作用有明显影响，当摇床转速增加时，菌株解磷能力逐渐增加，当转速达到 200 r/min 时，菌液中速效磷含量最高（114.5 mg/L），当转速达到 220 r/min 时，解磷能力降低，菌液中速效磷含量为 96.77 mg/L，比 200 r/min 时明显减少，二者有显著差异，其原因可能是转速过高，产生的剪切力对菌体造成机械损伤，降低了菌株的解磷能力[15]，结果表明菌株 JWP3 的最适培养转速为 200 r/min。

3　讨论

解磷微生物在土壤中磷循环相关的生物学系统中担任着重要的角色，它可以将难溶磷素转化为可溶性磷，提高磷肥利用率。解磷微生物分布十分广泛，但是，在自然条件下，这些解磷微生物在土壤中的数量不足，难以发挥其活性，仅仅依靠自然条件的作用不足以释放满足植物生长发育所需的磷素。因此，人们便设想从自然条件下或生物体内筛选解磷菌株，制成菌剂后回接到土壤中以转化足够的有效磷[9-10]。本试验从周至猕猴桃园根际土壤中筛选出9株具有解磷作用的菌

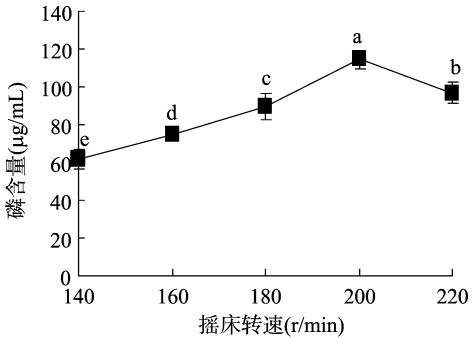


图6　菌株 JWP3 最适摇床转速

株,采用难溶性磷酸盐 $Ca_3(PO_4)_2$ 为磷源,对解磷菌株的降解能力进行测定,国内外已有许多关于解磷菌筛选的报道,解磷菌株多为芽孢杆菌和假单胞菌[11],其解磷能力一般在 31.5 ~519.7 mg/L 范围内[12-13],本试验筛选的菌株 JWP3 解磷能力为 114.5 mg/L,处于中等水平。通过菌株形态特征分析,及 16S rDNA 测序,并对序列进行比对确定菌株 JWP3 为胶质芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosu*)。

虽然微生物的溶磷能力取决于自身特征,如分泌质子、有机酸和其他物质的数量和种类[14],但培养条件的不同也影响了菌株的生长情况和降解特性,从陕西周至县猕猴桃园土壤中筛选得到的高效解磷菌株 JWP3 在最适培养条件下,其解磷能力达到 114.5 mg/L。试验表明,菌株 JWP3 在初始 pH 值为 7,转速 200 r/min,培养温度 30 ℃的条件下解磷能力最强。接种量的选择,综合了菌株解磷能力及经济效益等因素,接种量为 4% 时解磷能力达到 96.55 mg/L,与 5% 接种量时的 96.56 mg/L 无显著差异,故确定最适接种量为 4% 。

目前,大多数研究者认为解磷菌溶解无机磷是因为解磷微生物在新陈代谢过程中产生的各种有机酸[15-17],这些有机酸既能降低土壤 pH 值,又可通过螯合作用结合土壤中的铁铝钙镁等离子,从而使磷酸铁、磷酸钙、磷酸镁、磷酸铝等难溶性的磷酸盐溶解[18]。Illmer 等[10]研究认为假单孢菌属的解磷机制主要是产生质子,降低了培养基的 pH 值,从而使磷酸盐溶解。解磷菌的解磷机制是很复杂的,一种解磷菌可能有多个解磷机制[19],目前对解磷微生物的解磷机制还不是特别清楚,从猕猴桃园土壤中筛选得到的这株解磷菌株 JWP3,其解磷机制还需作进一步深入研究。

4　结论

本研究从周至猕猴桃园采集土样,筛选到 129 株高效解磷菌,通过复筛和解磷能力的测定,得到 1 株降解无机磷能力最强的菌株,利用 16S rDNA 基因序列分析方法对该菌株的分类信息进行鉴定,鉴定结果表明该菌株为胶质芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*),命名为菌株 JWP3,其解磷量达到了 114.5 mg/L,具有较高的解磷能力。通过试验确定了该菌株的最适培养条件:初始接种量 4% ,摇床转速 200 r/min,培养温度 30 ℃,初始 pH 值为 7,为菌株的开发利用提供了数据支持和理论基础。

参考文献:

[1]郝　晶,洪坚平,刘　冰,等. 石灰性土壤中高效解磷细菌菌株的分离、筛选及组合[J]. 应用与环境生物学报,2006,12(3):404 -408.

[2]Kucey R. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat[J]. Canadian Journal of Soil Science,1988,68(2):261 -270.

[3]赵小蓉,林启美. 微生物解磷的研究进展[J]. 土壤肥料,2001(3):7 -11.

[4]Vassileva M,Azcon R,Barea J M,et al. Effect of encapsulated cells of *Enterobacter* sp. on plant growth and phosphate uptake [J]. Bioresource Technology,1999,67(3):229 -232.

[5]Peix A,Rivas - Boyero A A,Mateos P F,et al. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions[J]. Soil Biology and Biochemistry,2001,33(1):103 -110.

[6]Zaidi A,Khan M S,Amil M. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.)[J]. European Journal of Agronomy,2003,19(1):15 -21.

[7]Bingquan F,Jiyun J,Cheng G. Isolation of *Penicillium oxalicum* and its effect on solubilization of insoluble phosphate under different conditions[J]. Scientia Agricultural Sinica,2002,35 (5):525 -530.

[8]史国英,莫燕梅,岑贞陆,等. 一株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析[J]. 微生物学通报,2015,42(7):1271 -1278.

[9]Molla M,Chowdhury A A,Islam A,et al. Microbial mineralization of organic phosphate in soil[J]. Plant and Soil,1984,78(3):393 -399.

[10]Illmer P,Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates - solubilization mechanisms[J]. Soil Biology and Biochemistry,1995,27(3):257 -263.

[11]银婷婷,王敬敬,柳　影,等. 高效解磷菌的筛选及其促生机制的初步研究[J]. 生物技术通报,2015,31(12):234 -242.

[12]Chen Y P,Rekha P D,Arun A B,et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology,2006,34(1):33 -41.

[13]Park J H,Bolan N,Megharaj M,et al. Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil [J]. Journal of Hazardous Materials,2011,185 (2/3):829 -836.

[14]赵　越,赵　霞,侯佳奇,等. 耐高温解无机磷菌的解磷特性及生长动态研究[J]. 东北农业大学学报,2013,44(8):64 -69.

[15]Kpomblekou A K,Tabatabai M. Effect of organic acids on the release of phosphorus from phosphate rocks[J]. Soil Science,1994,158(6):442 -448.

[16]Kim K Y,Jordan D,Krishnan H B. *Rahnella aquatilis*,a bacterium isolated from soybean rhizosphere,can solubilize hydroxyapatite[J]. FEMS Microbiology Letters,1997,153(2):273 -277.

[17]杨　芳,何园球,李成亮,等. 不同施肥条件下红壤旱地磷素形态及有效性分析[J]. 土壤学报,2006,43(5):793 -799.

[18]刘文干,何园球,张　坤,等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. 微生物学报,2012,52(3):326 -333.

[19]闫小梅,虞　丽,叶成龙,等. 一株灰潮土解磷菌的解磷特性及其对花生的促生作用[J]. 中国农学通报,2015,31(26):150 -155.