

网络出版时间:2014-01-02 16:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.058

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.02.058.html

土壤有机磷降解菌的筛选、鉴定及其生长特性研究

孙 薇¹, 谷 洁^{1,2}, 李玉娣¹, 钱 勋¹, 王小娟^{1,2}

(1 西北农林科技大学 资源环境学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省循环农业工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 【目的】从土壤中筛选有机磷降解菌, 并对其进行鉴定和生长特性研究, 为研制具有降解土壤有机磷功效的生物有机肥提供高效稳定的菌种。【方法】用解磷圈法和液体摇瓶培养法, 分别以植酸钙和卵磷脂为惟一磷源, 从采自陕西杨凌的农药厂排污渠、棉花地、果园、菜地等不同生态类型土壤中分离筛选有机磷降解菌, 对其进行生理生化特征分析和分子生物学鉴定, 并确定其最适生长温度和初始 pH 值。【结果】从采集的不同利用类型的土壤中共初筛分离出了 25 株有机磷降解菌, 复筛选出解磷率较高的 Z2-3、Z3-5、Z3-8、Z4-1 4 株植酸钙降解菌和 L5-2、L7-1 2 株卵磷脂降解菌。其中 Z2-3、Z3-5、Z3-8 和 Z4-1 在植酸钙液体培养基中的解磷率分别达到 64.2%, 71.5%, 67.2% 和 58.1%, L5-2 和 L7-1 在卵磷脂液体培养基中的解磷率分别为 76.7% 和 84.1%。生理生化特征测定结果和分子生物学分析结果表明, Z2-3、Z3-5、Z3-8、Z4-1、L5-2、L7-1 菌株依次为变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)和土壤短芽孢杆菌(*Brevibacillus agri*)。植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌的最适生长温度分别为 28~35 和 28 °C, 最适初始 pH 值分别为 8.0~8.5 和 7.5。【结论】分离、筛选、鉴定出了解磷率较高的 6 株有机磷降解菌, 获得了其最适生长温度和最适初始 pH 值。

[关键词] 有机磷降解菌; 分离筛选; 鉴定; 生长特性; 植酸钙; 卵磷脂

[中图分类号] X172

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)02-0199-08

Screening, identification and growth characteristics of soil organic phosphate degrading bacterial strains

SUN Wei¹, GU Jie^{1,2}, LI Yu-di¹, QIAN Xun¹, WANG Xiao-juan^{1,2}

(1 College of Natural Resource and Environment, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Research Center of Recycle Agricultural Engineering and Technology of Shaanxi Province, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】This study screened organic-phosphate degrading bacteria from soil, identified the bacteria, studied the physiological and biochemical characteristics to provide efficient and stable strains with ability of degrading soil organic phosphate as bio-organic fertilizers. 【Method】Using degrading circle method and liquid shake flask culture method, phytin and lecithin were used as the only phosphate source to screen bacteria from soil sample collected from various locations (the outfall of pesticide factory, cotton field, orchard and vegetable plot) in Yangling, Shaanxi and molecular biological method was utilized for identification. The proper temperature and initial pH for strains were investigated as well. 【Result】25 organic-phosphate degrading bacteria were screened from soil samples. Z2-3, Z3-5, Z3-8, and Z4-1 had high phytin degrading rates, and L5-2 and L7-1 had high lecithin degrading rates after recreening. The phytin degrading rates of Z2-3, Z3-5, Z3-8 and Z4-1 in liquid medium reached 64.2%, 71.5%, 67.2% and 58.1%,

[收稿日期] 2013-01-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(40871119, 41171203); 农业部“948”项目(2010-Z20)

[作者简介] 孙 薇(1987—), 女, 山东淄博人, 硕士, 主要从事环境微生物研究。E-mail: sunwei20090@163.com

[通信作者] 谷 洁(1963—), 男, 陕西西安人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事农业废弃物无害化处理与资源化利用研究。E-mail: gujoyer@sina.com

while lecithin degrading rates of L5-2 and L7-1 in liquid medium were 76.7% and 84.1%, respectively. Physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA analysis demonstrated that Z2-3, Z3-5, Z3-8, Z4-1, L5-2 and L7-1 were *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pantoea agglomerans* and *Brevibacillus agri*, respectively. The most suitable culture temperatures of phytin degrading bacteria and lecithin degrading bacteria were 28—35 °C and 28 °C, respectively, and the most suitable initial pH values of phytin degrading bacteria and lecithin degrading bacteria were 8.0—8.5 and 7.5, respectively. 【Conclusion】6 strains with high organic-phosphorus degrading rates were isolated and identified. The most suitable culture temperatures and initial pH values were obtained as well.

Key words: organic-phosphate degrading bacteria; isolation and identification; identification; growth characteristics; Phytin; lecithin

磷是植物生长所需的一种主要营养元素,但植物对土壤中的磷元素利用率很低,这严重影响着植物的生长^[1]。有机磷是土壤磷的重要组成部分,一般占土壤全磷的 20%~50%,其中植酸磷占有机磷的 10%~50%^[2],是土壤有机磷的主要存在形式。解磷菌能将植物难以吸收利用的难溶性或不溶性磷转化为可利用的形态,提高土壤中磷素的利用效率,减少化学肥料的施用,降低农业投入成本,因此对土壤环境进行微生物修复,是提高作物产量,解决土壤速效磷缺乏的重要途径之一^[3-4]。

土壤中存在的根际细菌、内部共生细菌被认为是最有效的解磷微生物,它们能将被土壤固定的矿物态磷释放出来,但是其在植物根际的数量不足以与其他微生物竞争,难以发挥其活性,因此筛选出具有高效溶磷能力的菌株,并将其添加到生物有机肥中,以供给作物充足的磷素显得尤为重要。我国对解磷细菌的研究起步于 20 世纪 50 年代,研究人员从东北黑土和灰化土中分离出具有解磷功能的巨大芽孢杆菌。现在对溶磷菌的研究主要集中于溶解无机磷菌株的筛选方面^[5-7],对于土壤难溶性有机磷解磷菌的研究却鲜有报道,而且已有研究中有有机磷降解菌的降解基质以卵磷脂为主,很少涉及其他磷源,仅见胡秀芳等^[8]以植酸磷为惟一磷源进行了有机磷降解菌的筛选。目前已报道的可以产植酸酶的微生物有细菌、酵母和真菌等^[9],其中植酸酶主要来源为真菌和芽孢杆菌^[10]。本研究选择 2 种有机磷培养基(植酸钙培养基、蒙金娜培养基),分离、筛选土壤有机磷降解菌,并对其进行鉴定,分析其最佳培养温度和最适初始 pH 值,以期后续研制具有降解土壤有机磷功效的生物有机肥提供高效、稳定的菌种及基础资料。

1 材料与方法

1.1 土样采集

以 5 点采样法,于 2011-09 在陕西省杨凌示范区(N 34° 16' 56.24"、E 108° 04' 27.95")的农药厂排污渠、棉花地、果园、菜地等不同生态类型的土地采集表层(0~20 cm)土壤于无菌袋中,标记采样日期、地点,4 °C 冰箱保存备用。

1.2 培养基

植酸钙固体培养基^[8]:葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.2 g, MgCl₂ · 6H₂O 5.0 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, KCl 0.1 g, 植酸钙(阿拉丁试剂(上海)有限公司) 2.0 g, 琼脂 16 g, 蒸馏水 1 000 mL。用该培养基筛选到的菌株为植酸钙降解菌。

蒙金娜固体培养基:葡萄糖 10.0 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g, MnSO₄ · 4H₂O 0.03 g, CaCO₃ 5.0 g, 蛋黄卵磷脂(北京奥博星生物技术有限责任公司) 1.0 g, 琼脂 16 g, 蒸馏水 1 000 mL。用该培养基筛选到的菌株为卵磷脂降解菌。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株的分离与纯化 取 5.0 g 新鲜土样于装有 45 mL 无菌水的 100 mL 三角瓶中,120 r/min 振荡 30 min 后进行 10 倍倍比稀释,分别取 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ 和 10⁻⁷ 的稀释液 200 μL,涂布于植酸钙和蒙金娜固体培养基上,于 28 °C 培养 3~5 d 后,筛选具有明显透明圈的菌落,分离纯化至少 3 次后,从以上 2 种培养基得到的即为植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌,接种到斜面培养基上,4 °C 保存。

1.3.2 土壤有机磷降解菌的筛选 (1)初筛。采用解磷圈法初筛。解磷圈是指在含有机磷的固体培养

基上,菌落周围产生的因有机磷降解而形成的透明圈,若解磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)大于 1,则表明有机磷被降解。解磷圈直径和 D/d 值并不能精确地反映菌株解磷能力的大小^[11],故解磷圈法仅可以作为初筛的方法对有机磷降解菌进行定性分析。将 1 μL 经 120 r/min 摇瓶培养 48 h 的 1.3.1 中分离纯化的植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌的菌悬液,滴加到植酸钙和蒙金娜固体培养基中央,以 1 μL 无菌水为对照,3 次重复。28 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 3~5 d (植酸钙降解菌培养 3 d,卵磷脂降解菌培养 5 d)后,用直尺测量解磷圈直径和菌落直径,并根据是否产生解磷圈以及 D/d 值的大小来初步确定菌株的解磷能力。

(2)复筛。采用液体摇瓶培养法复筛。在 150 mL 三角瓶中装入 50 mL 有机磷液体培养基,121 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 25 min,备用。将 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 摇瓶培养 48 h 的 1.3.1 中分离纯化的植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌的菌悬液,以 2 % 的体积比接种到植酸钙和蒙金娜液体培养基中,以培养基中加入等体积的无菌水为对照,3 次重复。摇床培养(28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min) 8 d 后,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 5 mL,用钼锑抗比色法^[12]测定 PO_4^{3-} 含量,计算解磷率:解磷率=(培养后接菌培养液中 PO_4^{3-} 含量-对照培养液中 PO_4^{3-} 含量)/培养前未接菌培养液中 PO_4^{3-} 含量 $\times 100\%$ 。

1.3.3 土壤有机磷降解菌的鉴定 菌株的生理生化特征测定参照东秀珠等^[13]的方法进行。

菌株的分子生物学鉴定:对获得的菌株纯培养后进行菌落 PCR。用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCC TGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 扩增 16S rDNA。PCR 反应体系(50 μL)为:2 $\times$ PCR 缓冲液 25 μL ,无菌水 22 μL ,引物 27F、1492r 及菌体各 1 μL 。PCR 反应扩增条件为:94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min,30 个循环。反应产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测合格后,送上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.3.4 土壤有机磷降解菌最适温度和初始 pH 值的确定 (1)最适温度。将 28 $^{\circ}\text{C}$ 下经 120 r/min 摇瓶培养 48 h 的 1.3.2 中复筛得到的植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌的菌悬液,以 2% 的体积比接种到植酸钙和蒙金娜液体培养基中,在不同温度下进行培养,其中植酸钙降解菌分别于 14,21,28,35,42 $^{\circ}\text{C}$ 培养,卵磷脂降解菌分别于 7,14,21,28,35 $^{\circ}\text{C}$ 下培

养,120 r/min 培养 48 h 后,测定菌悬液 PO_4^{3-} 含量。

(2)最适初始 pH 值。分别将植酸钙和蒙金娜液体培养基的初始 pH 值调节到 7.0,7.5,8.0,8.5 和 9.0,灭菌后,以 2% 的体积比接入培养 48 h 的 1.3.2 中复筛得到的植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌的菌悬液,120 r/min 摇瓶培养 48 h 后测定菌悬液 PO_4^{3-} 含量。

最适温度和初始 pH 值的确定试验中均以有机磷液体培养基中加入等体积无菌水作为对照,重复 3 次。

1.4 数据处理

试验数据的方差、差异显著性比较分别采用 Excel 2003 和 DPS 7.05 软件完成。

2 结果与分析

2.1 土壤有机磷降解菌的筛选

2.1.1 初 筛 解磷圈法是将解磷菌在含有机磷的固体培养基上培养,测定菌落周围产生的解磷圈直径(D),解磷圈直径与菌株解磷能力呈正相关关系,以此来初步判断菌株分解有机磷能力的强弱。通过筛选、纯化,共获得 25 株生长良好的土壤有机磷降解菌,包括 Z1-1、Z1-2、Z2-1、Z2-2、Z2-3、Z3-1、Z3-2、Z3-5、Z3-6、Z3-7、Z3-8、Z4-1 12 株植酸钙降解菌和 L2-1、L2-2、L3-1、L3-2、L5-1、L5-2、L5-3、L5-4、L5-5、L5-6、L6-1、L7-1、L8-1 13 株卵磷脂降解菌。对菌株的 D/d 值进行测定,结果(表 1)显示,植酸钙降解菌 D/d 值为 1.2~5.4。其中,Z3-6 的解磷圈直径(D)最大,菌落直径(d)较小, D/d 值最大,达到 5.4;菌株 Z2-1、Z3-2 和 Z3-8 D/d 值也较大,分别为 2.7,2.5 和 2.4;Z1-2 和 Z3-5 的解磷能力最差, D/d 值均为 1.2。用蒙金娜培养基筛选到的 13 株卵磷脂降解菌株中,只有 3 株菌形成透明圈, D/d 值由大到小依次为 L5-2、L3-1 和 L2-2,仅 L5-2 的 D/d 值较理想,达到 2.6。与胡子全等^[14]、陈倩颖^[15]的研究结果相比,本研究筛选菌株 Z3-6 培养 3 d 后的 D/d 值达到 5.4,说明解磷效果较好。

2.1.2 复 筛 解磷圈法只能定性地检测菌株的解磷能力,为了定量地了解菌株解磷能力强弱,本研究利用液体摇瓶培养测定菌悬液中 PO_4^{3-} 含量,计算菌株的解磷率,结果见表 2。由表 2 可知,定量与定性测定结果并不完全一致。以植酸钙为惟一磷源的培养基所筛选出的 12 株解磷菌中,3 株解磷率达到了 60% 以上,解磷率由大到小依次为 Z3-5

(71.5%)、Z3-8 (67.2%) 和 Z2-3 (64.2%);此外,Z4-1 的解磷率也较高,达到了 58.1%。以卵磷脂为惟一磷源的培养基所筛选出来的 13 株解磷菌中,L7-1 和 L5-2 解磷率较高,分别达到了 84.1%和 76.7%;其他菌株解磷率均较低,不超过 20%。由 D/d 值和解磷率来看,菌株对植酸钙的降解能力比卵磷脂高,这可能与化合物的性质有密切关系,植酸

钙易溶于酸,菌株在解磷过程中恰好分泌有机酸,使植酸钙中的磷大量溶解。陈倩颖^[15]由污水处理厂污泥中分离的 6 株有机磷降解菌的解磷率在 34.5%~66.0%;胡秀芳等^[8]从渥堆猪粪中分离出 1 株有机磷降解菌,其对植酸钙和卵磷脂的降解率分别为 84.29%和 87.4%。由此可见,本研究所筛选 6 株有机磷降解菌的解磷率均较高。

表 1 基于解磷圈法测定 25 株土壤有机磷降解菌的解磷能力

Table 1 Determination of phosphate degradation ability of 25 soil organic-phosphate degrading bacteria by transparency circle method							
菌株 Strains	解磷圈 直径(D)/mm Solubilizing circle diameter (D)	菌落 直径(d)/mm Colony diameter (d)	D/d	菌株 strains	解磷圈 直径(D)/mm Solubilizing circle diameter (D)	菌落 直径(d)/mm Colony diameter (d)	D/d
Z1-1	3.5±0.6 h	2.3±0.6 e	1.5±0.1 ef	L2-1	8.3±0.1 bcd	8.3±0.1 c	1.0±0.0 c
Z1-2	7.2±0.2 fg	5.9±0.1 a	1.2±0.0 f	L2-2	7.3±2.3 cde	6.2±1.8 de	1.2±0.0 c
Z2-1	15.6±1.0 b	5.7±0.3 a	2.7±0.1 b	L3-1	8.2±2.6 bcd	5.5±0.3 ef	1.5±0.4 b
Z2-2	9.5±0.6 cd	4.8±1.0 abc	2.0±0.4 cde	L3-2	5.3±0.3 fg	5.3±0.3 ef	1.0±0.0 c
Z2-3	9.4±0.5 cde	5.1±1.0 abc	1.9±0.4 de	L5-1	10.0±0.7 ab	10.0±0.7 a	1.0±0.0 c
Z3-1	9.1±0.4 def	5.9±0.4 a	1.5±0.0 ef	L5-2	10.4±1.0 a	4.8±0.6 f	2.6±0.2 a
Z3-2	14.5±1.9 b	5.7±0.6 a	2.5±0.6 bc	L5-3	6.8±0.5 def	6.8±0.5 d	1.0±0.0 c
Z3-5	5.7±0.5 g	4.8±0.5 abc	1.2±0.0 f	L5-4	9.5±0.5 ab	9.5±0.5 ab	1.0±0.0 c
Z3-6	23.1±1.4 a	4.3±0.4 cd	5.4±0.8 a	L5-5	4.7±0.5 g	4.7±0.5 f	1.0±0.0 c
Z3-7	7.2±1.7 efg	3.3±1.5 de	2.2±0.6 bed	L5-6	8.7±1.2 abc	8.7±1.2 bc	1.0±0.0 c
Z3-8	10.7±1.0 cd	4.5±0.5 bcd	2.4±0.0 bed	L6-1	5.6±0.4 efg	5.6±0.4 ef	1.0±0.0 c
Z4-1	11.5±1.7 c	5.5±0.6 ab	2.1±0.2 cde	L7-1	7.1±0.1 cdef	7.1±0.1 d	1.0±0.0 c
				L8-1	4.5±0.3 g	4.5±0.3 f	1.0±0.0 c

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异达到显著水平($P<0.05$)。下表同。
Note:Different lowercase letters in the same column mean significant difference ($P<0.05$). The same below.

表 2 基于液体摇瓶培养法测定的 25 株土壤有机磷降解菌的解磷能力

Table 2 Determination of phosphate degradation ability of 25 soil organic-phosphate degrading bacteria by shake flask culture method					
菌株 Strains	解磷率/% Phosphate degradation rate	菌株 Strains	解磷率/% Phosphate degradation rate	菌株 Strains	解磷率/% Phosphate degradation rate
Z1-1	53.3±3.7 cd	Z3-5	71.5±3.2 a	L2-1	8.5±1.5 def
Z1-2	26.1±2.5 g	Z3-6	47.1±3.7 def	L2-2	15.2±2.4 cd
Z2-1	54.4±1.9 cd	Z3-7	56.6±2.0 bc	L3-1	1.1±0.4 f
Z2-2	47.6±1.9 de	Z3-8	67.2±1.7 a	L3-2	7.7±1.4 def
Z2-3	64.2±2.7 ab	Z4-1	58.1±5.6 bc	L5-1	11.8±1.6 de
Z3-1	38.9±2.7 f			L5-2	76.7±7.2 b
Z3-2	41.0±2.1 ef			L5-3	6.3±0.7 ef
				L5-4	14.1±2.2 cde
				L5-5	15.1±3.2 cde
				L5-6	21.8±3.9 c
				L6-1	0.0±0.0 f
				L7-1	84.1±5.1 a
				L8-1	0.0±0.0 f

2.2 土壤有机磷降解菌的鉴定

2.2.1 生理生化特征 筛选到的 6 株土壤有机磷降解菌的生理生化特征测定结果见表 3。由表 3 可见,6 株菌的甲基红试验、V-P 反应、淀粉酶试验均为阴性反应;过氧化氢酶试验结果为阳性,但强弱不一,其中某些菌株的过氧化氢酶活性较高,如 L7-1、Z3-8;仅 L5-2 可以还原亚硝酸盐;除 Z2-3 和 L7-1 外,其他菌株均可产生硝酸还原酶;氧化酶试验呈阳

性的菌株有 Z3-5、Z3-8 和 Z4-1。以上试验中,Z3-5、Z3-8 和 Z4-1 各项试验测定结果一致,查阅相关文献^[13],结果表明,此 3 种菌株均符合假单胞菌属的生理生化特征;其他菌株间的生理生化试验结果有一定差异,还不能确定其种属。鉴于根据生理生化特征结果不能判断出菌株的种属,故需结合分子生物学手段对其进行进一步鉴定。

表 3 6 株土壤有机磷降解菌的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical properties of 6 soil organic-phosphate degrading bacteria

试验 Experiments	Z2-3	Z3-5	Z3-8	Z4-1	L5-2	L7-1
甲基红试验 Methyl red test	—	—	—	—	—	—
V-P 反应 V-P reaction	—	—	—	—	—	—
氧化酶试验 Oxidase test	—	+	+	+	—	—
过氧化氢酶试验 Catalase test	+	+	++	+	+	++
淀粉酶试验 Amylase test	—	—	—	—	—	—
亚硝酸还原酶试验 Nitrite reductase test	—	—	—	—	+	—
硝酸还原酶试验 Nitrate reductase test	—	+	+	+	+	—

注:“++”为强阳性反应,“+”为阳性反应,“—”为阴性反应。
Note:“++” represents strong positive,“+” represents positive,“—” represents negative.

2.2.2 分子生物学鉴定 以筛选的有机磷降解菌菌株 Z3-5 的总 DNA 为模板,利用细菌 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物。与 GenBank 中同源性序列相比,菌株 Z3-5 与 *Pseudomonas putida* strain HTc1(JF703647.1) 的序列同源性达到了 100%,结合生理生化特征测定结果,将菌株 Z3-5 鉴定为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*);同理,Z2-3 与 *Pseudomonas plecoglossicida* strain R8-323(JQ659931.1) 的序列同源性达到了 100%,故将菌株 Z2-3 鉴定为变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*);Z3-8 与 *Pseudomonas fluorescens* gene(AB680223.1) 同源性达到了 99% 以上,结合生理生化特征测定结果,将菌株 Z3-8 鉴定为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*);Z4-1 与 *Pseudomonas fluorescens* (AB681970.1) 的序列同源性达到了 100%,结合生理生化特征测定结果,

将其鉴定为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*);L5-2 与 *Pantoea agglomerans* (EU879089.1) 同源性达到了 99% 以上,鉴定为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*);L7-1 与 *Brevibacillus* sp. (dq207364.1) 同源性达到了 99% 以上,结合生理生化特征测定结果,将菌株 L7-1 鉴定为土壤短芽孢杆菌(*Brevibacillus agri*)。

2.3 有机磷降解菌最适温度和初始 pH 值的确定
2.3.1 最适温度 温度是影响微生物生长和代谢的一个重要因素,当温度在微生物适宜的范围内变化时,微生物生长和代谢正常且平稳,当温度超过这个范围时,则微生物生长代谢缓慢甚至停滞死亡^[16]。为使菌株较好地发挥其解磷能力,本试验对不同温度下土壤有机磷降解菌的解磷率进行了研究,结果如图 1 所示。

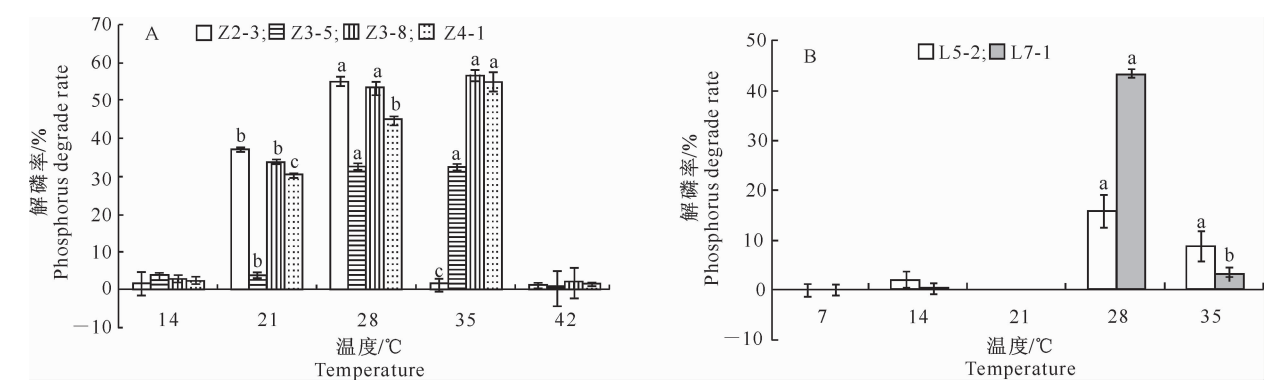


图 1 温度对土壤有机磷降解菌解磷率的影响
A. 植酸钙降解菌; B. 卵磷脂降解菌;
Fig. 1 Effect of temperature on organic-phosphate degrading rates of soil organic-phosphate degrading bacteria
A. Phytin degrading bacteria; B. Lecithin degrading bacteria;
Different letters at the same bacteria mean significant difference ($P<0.05$). The same in figure 2

由图 1 可知,Z2-3 与 Z3-5 在 28 °C 时解磷率最高,分别达到 55.1% 和 32.5%;Z3-8 和 Z4-1 在 35 °C 时解磷效果最好,解磷率分别高达 56.6% 和 54.9%。方差分析结果显示,Z3-5 和 Z3-8 在 28 与 35 °C 时解磷率均较高,且 2 个温度下解磷率无显著差异($P>0.05$),分别与二者其他温度处理的解磷

率差异显著 ($P<0.05$),说明其最适培养温度为 28~35℃;Z2-3 和 Z4-1 在 28 和 35℃ 条件下的解磷率分别与二者其他温度处理差异显著,说明其最适温度分别为 28 和 35℃。L5-2 与 L7-1 最适解磷温度均为 28℃,解磷率分别达到了 15.8% 和 43.6%;L5-2 在 28 和 35℃ 时的解磷率无显著差异,L7-1 在 28℃ 下的解磷率与其他温度处理差异显著;二者在 21℃ 时均不能生长,故解磷率为 0%。总之,不同菌株的最适解磷温度不同,但都集中在 28~35℃,其中,28℃ 时大多数有机磷降解菌株的解磷率均可保持在较高水平,这与贺梦醒等^[17]的研究结果一致。

2.3.2 最适初始 pH 值 pH 值是菌种生长的环境因子,对微生物生长的影响很大。在培养微生物时,改变 pH 值可以引起细胞膜电荷发生变化,并影响营养物质离子化程度,从而影响微生物对营养物的吸收^[18]。另外,生物体内的所有代谢过程都受酶的控制,酶的催化反应又依赖 pH,这也说明环境的 pH 值对生物体生长有明显影响^[19]。有机磷降解菌是通过有机磷降解酶来降解环境中的有机磷,确定合适的初始 pH 值有利于提高有机磷的降解效率。不同初始 pH 值对土壤有机磷降解菌解磷率的影响如图 2 所示。

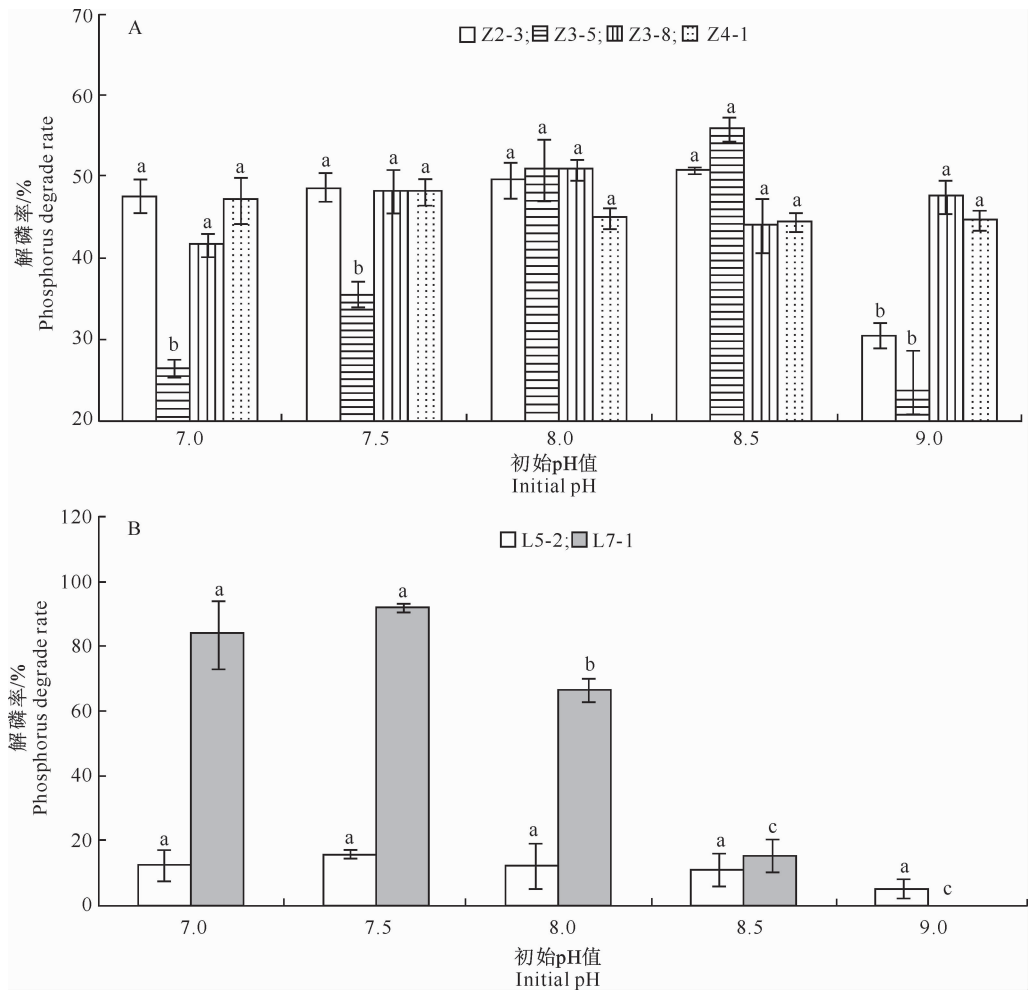


图 2 初始 pH 值对土壤有机磷降解菌解磷率的影响
A. 植酸钙降解菌;B. 卵磷脂降解菌

Fig. 2 Effect of initial pH on organic-phosphate degrading rates of soil organic-phosphate degrading bacteria
A. Phytin degrading bacteria;B. Lecithin degrading bacteria

由图 2 可以看出,Z2-3 在初始 pH=8.5 时解磷率最高,达到 50.91%,除与初始 pH=9.0 处理解磷率差异显著外,与其他处理均无显著差异;Z3-5 在初始 pH 值为 8.0 和 8.5 时解磷率均较高,显著高

于其他处理;Z3-8 和 Z4-1 解磷率受初始 pH 值的影响不大,各处理间差异不显著。在初始 pH=7.5 时,L5-2 与 L7-1 的解磷率均最高。L7-1 在初始 pH 为 7.0 和 7.5 时解磷率均较高,且二者间无显著差

异,均与初始 pH 为 8.0,8.5 和 9.0 时差异显著;虽然 L5-2 在初始 pH=7.5 时解磷率最高,但与其他处理无显著差异。无论是在不同温度还是在不同初始 pH 条件下培养,L5-2 的解磷率都不理想,这可能是因为其生长缓慢,在培养 48 h 时未达到稳定期所致。

3 讨 论

本试验分别采用植酸钙和卵磷脂为惟一磷源的有机磷固体培养基,从陕西杨凌农药厂排污渠、棉花地、果园、菜地等地的表层土壤中,初筛出了 25 株生长良好的有机磷降解菌。筛选出的菌株大多来自农药厂排污渠土壤,推断农药对于微生物的解磷能力具有一定的底物诱导作用。林启美等^[20]通过分析农田、林地、草地和菜地土壤解磷菌数量,发现菜地土壤解磷细菌的数量和种类最多,这可能是肥料及农药诱导所致。

本研究采用液体摇瓶培养法进行复筛,分别得到解磷率较高的 Z2-3、Z3-5、Z3-8、Z4-1 4 株植酸钙降解菌和 L5-2、L7-1 2 株卵磷脂降解菌。其中 Z2-3、Z3-5、Z3-8 和 Z4-1 在植酸钙液体培养基中的解磷率分别达到 64.2%,71.5%,67.2%和 58.1%,L5-2 和 L7-1 在卵磷脂液体培养基中的解磷率分别为 76.7%和 84.1%。Milko 等^[21]从不同植株(黑麦草、白三叶、小麦、燕麦和羽扇豆)根际土壤中分离到的有机磷降解菌的解磷能力最高可达到 $(29.92 \pm 1.45) \mu\text{mol/L}$;Tao 等^[22]从亚热带灌溉和温带非灌溉土壤中分离出 10 株有机磷降解菌,菌株溶磷量为 13.8~62.8 $\mu\text{g/mL}$ 。将复筛得到的 6 株有机磷降解菌进行生理生化特征测定,并结合分子生物学手段进行鉴定,结果为:Z2-3 为变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*),Z3-5 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),Z3-8 与 Z4-1 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),L5-2 为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*),L7-1 为土壤短芽孢杆菌(*Brevibacillus agri*)。研究表明,土壤细菌群落中,根际土分离的假单胞菌、芽孢杆菌和根际共生菌有较强的解磷能力^[23],而本研究所筛选的菌株大部分也为假单胞菌及芽孢杆菌。

本研究结果表明,植酸钙降解菌适宜生长温度为 28~35℃,卵磷脂降解菌则为 28℃。Jiang 等^[24]研究认为,随着温度的升高(最高 35℃),细菌生物量增加。本研究中,以植酸钙为惟一磷源时所筛菌株最适初始 pH 为 8.0~8.5;以卵磷脂为惟一磷源时所筛菌株最适初始 pH 为 7.5。刘文干等^[25]

研究表明,pH 值与溶磷量呈显著负相关。但陈俊等^[26]研究表明,溶磷细菌的溶磷能力与 pH 无显著相关性。

4 结 论

1)分别以植酸钙和卵磷脂为惟一磷源的有机磷固体培养基,从不同利用类型的土壤中分离筛选出了 Z3-5、Z3-8、Z2-3、Z4-1、L5-2 和 L7-1 6 株解磷能力较强的菌株,其解磷率分别达到 71.5%,67.2%,64.2%,58.1%,76.7%和 84.1%。

2)依据生理生化特征以及分子生物学手段,对筛选到的 6 株解磷能力较强的菌株进行鉴定,结果显示:Z2-3 为变形假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*),Z3-5 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),Z3-8 与 Z4-1 为荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*),L5-2 为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*),L7-1 为土壤短芽孢杆菌(*Brevibacillus agri*)。

3)植酸钙降解菌和卵磷脂降解菌的最适生长温度分别为 28~35 和 28℃,最适初始 pH 分别为 8.0~8.5 和 7.5。

[参考文献]

- [1] Abd-Alla M H. Phosphatases and the utilization of organic phosphorus by Rhizobium-leguminosarum biovar viceae [J]. Letters in Applied Microbiology,1994,18(5):294-296.
- [2] Dalal R C. Soil organic phosphorus [J]. Advances in Agronomy,1977,29:83-117.
- [3] 张宝贵,李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用 [J]. 土壤学报,1998,35(1):104-111.
Zhang B G, Li G T. Roles of soil organisms on the enhancement of plant availability of soil phosphorous [J]. Acta Pedologica Sinica,1998,35(1):104-111. (in Chinese)
- [4] 冯月红,姚 拓,龙瑞军. 土壤解磷菌研究进展 [J]. 草原与草坪,2003(1):3-7.
Feng Y H, Yao T, Long R J. Research progress of phosphate-dissolving microorganisms in plant rhizosphere [J]. Grassland and Turf,2003(1):3-7. (in Chinese)
- [5] 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.
Liu J, Gu J, Gao H, et al. Isolation and identification of inorganic phosphorus-solubilizing bacteria by Biolog and molecular method [J]. Agricultural Research in the Arid Areas,2012,30(1):184-189. (in Chinese)
- [6] 段秀梅,高晓蓉,吕 军,等. 两株土壤分离菌的解磷能力及对玉米的促生作用 [J]. 中国土壤与肥料,2010(2):79-85.
Duan X M, Gao X R, Lü J, et al. Two phosphate solubilizing

- bacteria from calcareous soil solubilizing phosphate capacity and promoting effect on corn seedling growth [J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2010(2): 79-85. (in Chinese)
- [7] 虞伟斌, 杨兴明, 沈其荣, 等. K3 解磷菌的解磷机理及其对缓冲容量的响应 [J]. 植物营养与肥科学报, 2010, 16(2): 354-361. Yu W B, Yang X M, Shen Q R, et al. Mechanism on phosphate solubilization of *Pseudomonas* sp. K3 and its phosphate solubilization ability under buffering condition [J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2010, 16(2): 354-361. (in Chinese)
- [8] 胡秀芳, 陈集双, 陈海敏. 一株有机磷降解菌的筛选、鉴定及其解磷功效 [J]. 中国环境科学, 2005, 25(3): 353-356. Hu X F, Chen J S, Chen H M. Screening and identification of one organophosphate-degradation bacterium and its phosphate-degradation efficacy [J]. China Environmental Science, 2005, 25(3): 353-356. (in Chinese)
- [9] 施安辉, 王光玉, 李桂杰. 目前国内外植酸酶研究进展 [J]. 中国酿造, 2005, 6(5): 5-10. Shi A H, Wang G Y, Li G J. Research development of phytase both at home and abroad [J]. China Brewing, 2005, 6(5): 5-10. (in Chinese)
- [10] 吴琦, 刘世贵, 王红宁. 芽孢杆菌植酸酶研究进展 [J]. 中国饲料, 2003(12): 11-13. Wu Q, Liu S G, Wang H N. Research progress of bacillus phytase [J]. China Feed, 2003(12): 11-13. (in Chinese)
- [11] 刘江. 无机磷细菌的筛选及其 Biolog 和分子生物学鉴定 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2011. Liu J. Isolation and identification of inorganic phosphorus-solubilizing bacteria by Biolog and molecular method [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)
- [12] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法 [M]. 北京: 科学出版社, 2008. Li Z G, Luo Y M, Teng Y. Research methods of soil and environmental bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2008. (in Chinese)
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 1999. Dong X Z, Cai M Y. Identification manual of common bacteria [M]. Beijing: Science Press, 1999. (in Chinese)
- [14] 胡子全, 赵海泉. 一株有机解磷菌的筛选及其最佳生长条件的研究 [J]. 中国给水排水, 2007, 23(17): 66-70. Hu Z Q, Zhao H Q. Screening of one organophosphate-degradation bacterium and its optimum growth condition [J]. China Water & Wastewater, 2007, 23(17): 66-70. (in Chinese)
- [15] 陈倩颖. 解有机磷细菌的分离鉴定及其解磷特性研究 [D]. 安徽芜湖: 安徽农业大学, 2009. Chen Q Y. Screening, identification, and research of organic phosphate-solubilizing characteristics of organophosphate-degradation bacterium [D]. Wuhu, Anhui: Anhui Agriculture University, 2009. (in Chinese)
- [16] 李阜棣, 胡正嘉. 微生物学 [M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2000. Li F D, Hu Z J. Microbiology [M]. 5th ed. Beijing: Chian Agriculture Press, 2000. (in Chinese)
- [17] 贺梦醒, 高毅, 胡正雪, 等. 解磷菌株 B25 的筛选鉴定及其解磷能力 [J]. 应用生态学报, 2012, 23(1): 235-239. He M X, Gao Y, Hu Z X, et al. Screening, identification, and organic phosphate-solubilizing capability of phosphate-solubilizing bacterial strain B25 [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2012, 23(1): 235-239. (in Chinese)
- [18] 王成华, 孙纳新. 里氏木霉 91-3 纤维素酶产生条件的研究 [J]. 食品与发酵工业, 1996(5): 1-5. Wang C H, Sun N X. Studies on the conditions for cellulase production from *Trichoderma reesei* 91-3 [J]. Food and Fermentation Industries, 1996(5): 1-5. (in Chinese)
- [19] 徐乐中. pH 值碱度对脱氮除磷效果的影响及控制方法 [J]. 给水排水, 1994, 22(1): 10-13. Xu L Z. Effect on N and P removals and control of pH and alkalinity [J]. Water & Wastewater Engineering, 1994, 22(1): 10-13. (in Chinese)
- [20] 林启美, 赵小蓉, 孙众鑫, 等. 四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布 [J]. 土壤与环境, 2000, 9(1): 34-37. Lin Q M, Zhao X R, Sun Z X, et al. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems [J]. Soil and Environmental Sciences, 2000, 9(1): 34-37. (in Chinese)
- [21] Milko A J, Marcela T H, Zed R, et al. Isolation of culturable phosphobacteria with both phytate-mineralization and phosphate-solubilization activity from the rhizosphere of plants grown in a volcanic soil [J]. Biol Fertil Soils, 2008, 44: 1025-1034.
- [22] Tao G C, Tian S J, Cai M Y, et al. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils [J]. Pedosphere, 2008, 18(4): 515-523.
- [23] Igual J M, Valverde A, Cervantes E, et al. Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: Use of updated molecular techniques in their study [J]. Agronomie, 2001, 21: 561-568.
- [24] Jiang X, Jin X C, Yao Y, et al. Effects of biological activity, light, temperature and oxygen on phosphorus release processes at the sediment and water interface of Taihu Lake, China [J]. Water Research, 2008, 42(8): 2251-2259.
- [25] 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. Liu W G, He Y Q, Zhang K, et al. Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 326-333. (in Chinese)
- [26] 陈俊, 陆俊锐, 康丽华, 等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养 [J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1183-1188. Chen J, Lu J K, Kang L H, et al. Primary identification, capability of phosphate-solubilization and optimization of medium of some microorganism from mangrove [J]. Microbiology, 2009, 36(8): 1183-1188. (in Chinese)