

一株溶磷细菌的分离、鉴定及其溶磷特性研究^①

孙珊, 黄星, 范宁杰, 冯昭中, 李会会, 李顺鹏

(南京农业大学生命科学院, 农业部环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095)

摘要: 从作物根际土壤样品中筛选到一株溶 P 能力强的菌株 GJT-1, 结合生理生化指标和16S rDNA 序列分析鉴定其为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。菌株 GJT-1 对磷酸三钙、磷酸铝、磷酸铁有一定的溶解能力, 28℃ 培养到第 3 天对磷酸三钙液体培养基的溶 P 量可达 224.51 mg/L。该菌对开阳磷矿粉和宜昌磷矿粉的溶 P 量分别为 194.25 mg/L 和 120.59 mg/L。通过扫描电镜观察到接种活菌处理的磷矿粉表面凹凸且有黏性物质附着, 表明菌株 GJT-1 可利用磷矿粉。

关键词: 溶磷菌; *Pseudomonas* sp.; 溶磷能力; 有效磷

中图分类号: S154.39

磷 (P) 是农作物生长发育所必需的三大营养元素之一^[1]。我国土壤中全 P 含量为 0.4~1.0 g/kg, 但这些 P 素的 95% 为无效态 P, 很难为植物吸收利用^[2]。为了提高作物产量, 每年需施用大量 P 肥。但是, 施入的可溶性 P 肥易与土壤中的 Fe^{3+} 、 Ca^{2+} 和 Al^{3+} 等结合, 形成难溶的磷酸盐沉积, 导致 P 肥当季使用率只有 5%~10%^[3]。同时, 大量 P 肥的使用造成土壤 P 素的积累, 导致 P 肥的浪费, 还污染了生态环境。

大量研究表明, 土壤中许多微生物具有溶 P 的作用, 能将植物难以吸收利用的 P 素物质转化为植物可吸收利用形态, 提高作物产量^[4-6], 具有这种能力的微生物被称为溶磷微生物 (phosphate-solubilizing microorganism)。分离筛选高效溶磷菌, 利用溶磷微生物溶解积累于土壤中的 P, 可以提高 P 的利用率, 减少化肥的过量使用。在 P 素贫乏的土壤上可将加入溶磷微生物的磷矿粉作为 P 肥施入土壤, 促进植物的生长, 是解决土壤中 P 缺乏的重要途径之一^[7-8]。目前已报道的溶磷微生物很多, 有细菌、真菌、放线菌等。不同种类的溶磷菌或菌株之间的溶 P 能力和接种效果差异大, 所以, 从土壤根际中筛选高效溶磷微生物, 并对其溶 P 活力进行研究是目前的热点之一。

本文拟从作物根际土壤中分离、鉴定高效溶磷菌, 以为溶磷微生物肥料的开发提供优良菌株与应用依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试土壤: 取自南京市东郊农田小麦、白菜、菠菜、水稻等作物的根际土壤, 采样深度 10~20 cm, 置 4℃ 冰箱中保存, 备用。

培养基: ①分离培养基 (改良后的 PVK^[9]): 葡萄糖 10 g/L, NaCl 0.2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g/L, KCl 0.2 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g/L, $Ca_3(PO_4)_2$ 5.0 g/L, 酵母浸膏 0.5 g/L, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.002 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.002 g/L, 0.4% 溴酚蓝 (pH 6.7) 6 ml/L, 加蒸馏水至 1000 ml, pH 自然。②筛选培养基 (NBRI^[10]): 葡萄糖 10 g/L, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 5.0 g/L, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.25 g/L, KCl 0.2 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 g/L, $Ca_3(PO_4)_2$ 5.0 g/L, 加蒸馏水至 1000 ml, pH 7.0。③LB 培养基: 蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, NaCl 5 g/L, 加蒸馏水至 1000 ml, pH 7.0~7.2。

供试 P 源: 难溶磷酸盐为磷酸三钙 ($Ca_3(PO_4)_2$)、磷酸铝 ($AlPO_4$), 购于天津科密欧试剂公司; 磷酸铁 ($FePO_4$) 购于 SIGMA 试剂公司。磷矿粉: 宜昌磷矿粉 (Yichang RP)、开阳磷矿粉 (Kaiyang RP), 所有磷矿石粉碎过筛。用 2% 的柠檬酸浸提, 钒钼黄法测定磷矿粉有效 P 含量; 用钼蓝比色法检测磷矿粉水溶性 P 含量; 用硝酸浸提 (1:1), 钒钼黄法测定磷矿粉全 P 含量^[11], 测定结果如表 1 所示。

①基金项目: 科技部平台建设项目 (2005DKA21201-2) 和南京市科技发展计划项目 (200901070) 资助。

* 通讯作者 (lsp@njau.edu.cn)

作者简介: 孙珊 (1983—), 女, 安徽宣城人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物研究。E-mail: sunshan1927@163.com

表 1 各种磷矿粉的 P 含量 (g/kg)
Table 1 Phosphorus contents in phosphorite powders

磷矿粉	全 P	有效 P	水溶性 P
宜昌磷矿粉	21.33	2.964	0.124
开阳磷矿粉	21.53	3.952	0.076

1.2 溶磷菌的分离筛选

1.2.1 溶磷菌株初筛 称取 1 g 土样溶于 99 ml 无菌水中, 用 10 倍稀释法分别配制 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} g/ml 的土壤悬液, 分别涂布到分离培养基上, 28℃ 培养 4 天, 观察出现溶 P 圈的菌落, 测定溶 P 圈直径 (D)、菌落直径 (d), 根据能否产生溶 P 圈与 D/d 值大小来初步确定菌株的溶 P 能力。将 $D/d=1.5$ 的菌株利用平板划线法分离纯化后, 4℃ 下保存于 LB 斜面培养基, -70℃ 保存菌种于甘油管中。

1.2.2 摇瓶复筛 250 ml 三角瓶中装入液体筛选培养基 100 ml, 高压灭菌 121℃、25 min 备用。将在 LB 斜面培养基上生长 12 h 的细菌制成菌悬液 (菌数约为 1×10^7 CFU/ml), 将溶磷菌悬液 1 ml 接种于上述灭菌的液体筛选培养基中, 以不接菌为对照, 每个处理 3 次重复, 摇床培养 (28℃, 160 r/min) 3 天, 测定有效 P 含量和 pH 值。

1.3 菌株溶磷效果测定

1.3.1 菌悬液制备 菌株接种于 LB 液体培养基中摇培过夜, 菌体离心, 用无菌水洗 2 次, 制备成菌悬液, 菌数约为 1×10^7 CFU/ml。

1.3.2 菌株对 3 种难溶性磷酸盐溶解能力测定 三角瓶中装入 100 ml 已灭菌的筛选 P 培养基, 难溶磷酸盐浓度为 5 g/L, 分别接种 1 ml 菌悬液, 28℃, 160 r/min 摇床培养 7 天。培养液 12000 r/min, 4℃ 离心 5 min, 取上清液测定有效 P 含量和 pH 值。设不接菌为对照, 每个处理重复 3 次。

1.3.3 菌株对 2 种磷矿粉溶解能力的测定 取 1 ml 菌液接入到 100 ml 筛选培养基中, P 源选用磷矿粉, 加入量为 5 g/L, 在 28℃、160 r/min 摇床条件下培养 14 天, 测定培养液中有效 P 含量。设接空白培养基、灭活菌液、活菌液 3 种处理, 每个处理重复 3 次。

1.3.4 扫描电镜观察 将接空白培养基、灭活菌液、活菌液经摇床培养 14 天后的磷矿粉与原样一起烘干, 按常规方法制样, 用扫描电镜 Hitachi S-3000N 进行观察、拍照。

1.3.5 测定方法 用 pHS-29A 型酸度计测定发酵液的 pH 值。将发酵液在 4000 r/min 下离心 10 min, 取

上清液稀释适当倍数, 利用 UV3010 紫外可见分光光度计在 700 nm 处通过钼锑抗比色法^[12]测定光密度并计算有效 P 含量, 溶 P 量为扣除不接种对照的值。数据采用 DPS 统计软件进行分析。

1.4 菌种鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献^[13]进行。菌株 16S rDNA 的克隆及序列测定, 同源性分析, 进化树构建参照文献^[14]。

2 结果和分析

2.1 溶磷菌在固体和液体培养基上的溶磷效果

从采集的土壤样品中分离到 57 株在固体培养基上具有明显溶 P 圈 ($D/d \geq 1.5$) 的菌株, 其中 $D/d \geq 3.5$ 的有 9 株, $D/d \geq 2.5$ 的有 27 株, 占有溶 P 圈菌株总数的 63.2%。

再将 57 株有明显溶 P 圈的菌株分别接种在液体培养基中培养 3 天后, 测定其上清液可溶性 P 含量, 结果表明, 溶磷菌株之间溶 P 能力不同, 其有效 P 增量在 53.29 ~ 224.51 mg/L 之间。实验结果表明, 菌株 GJT-1 在分离固体培养基上, 生长至第 4 天时溶 P 圈直径/菌落直径 (D/d) 为 3.71, 在筛选液体培养基上生长至第 3 天时溶 P 量可达 224.51 mg/L, 溶 P 能力较强, 本试验选择其作为供试菌株。在实验中发现, 采用溶 P 圈观察法测定的结果与在筛选液体培养基摇床振荡培养条件下测得的菌株溶 P 能力大小不完全一致, 这可能与菌株在两种培养条件下的生长过程和方式不同有关。在筛选固体培养基上测定溶 P 能力, 主要是通过菌株自身产生的有机酸, 经过渗透扩散在其周围形成一个明显的透明圈来确定该菌株是否有溶解 P 的能力^[15]。许多研究表明, 将在平板上表现出溶 P 能力的菌株, 纯化后进行液体培养, 发现不少细菌失去了溶 P 活性, 或溶 P 活性大幅度下降; 而在平板上未表现出溶 P 能力的菌株, 经过液体振荡培养, 发现不少细菌表现出溶 P 活性^[16-18]。溶 P 能力与平板上的溶 P 圈大小没有相关性, 所以采用液体培养筛选的方法更为合理。

2.2 菌株 GJT-1 对磷酸盐的溶磷能力

菌株 GJT-1 对不同磷酸盐的亲亲和溶解能力不同, 但溶 P 趋势均先是增加再逐渐下降并趋于稳定。如图 1 所示, 磷酸三钙液体培养基接种 GJT-1, 0 ~ 72 h 溶 P 量逐渐提高, 到 72 h 达到最大, 为 224.51 mg/L, pH 值逐渐下降, 72 h 为 4.54。磷酸铝液体培养基接种 GJT-1, 到 96 h 溶 P 量达到最大, 为 62.71 mg/L, pH 值下降为 4.36。磷酸铁液体培养基接种 GJT-1, 到 96 h 溶 P 量达到最大, 为 17.41 mg/L, pH 值下降为 4.45。在液体摇瓶

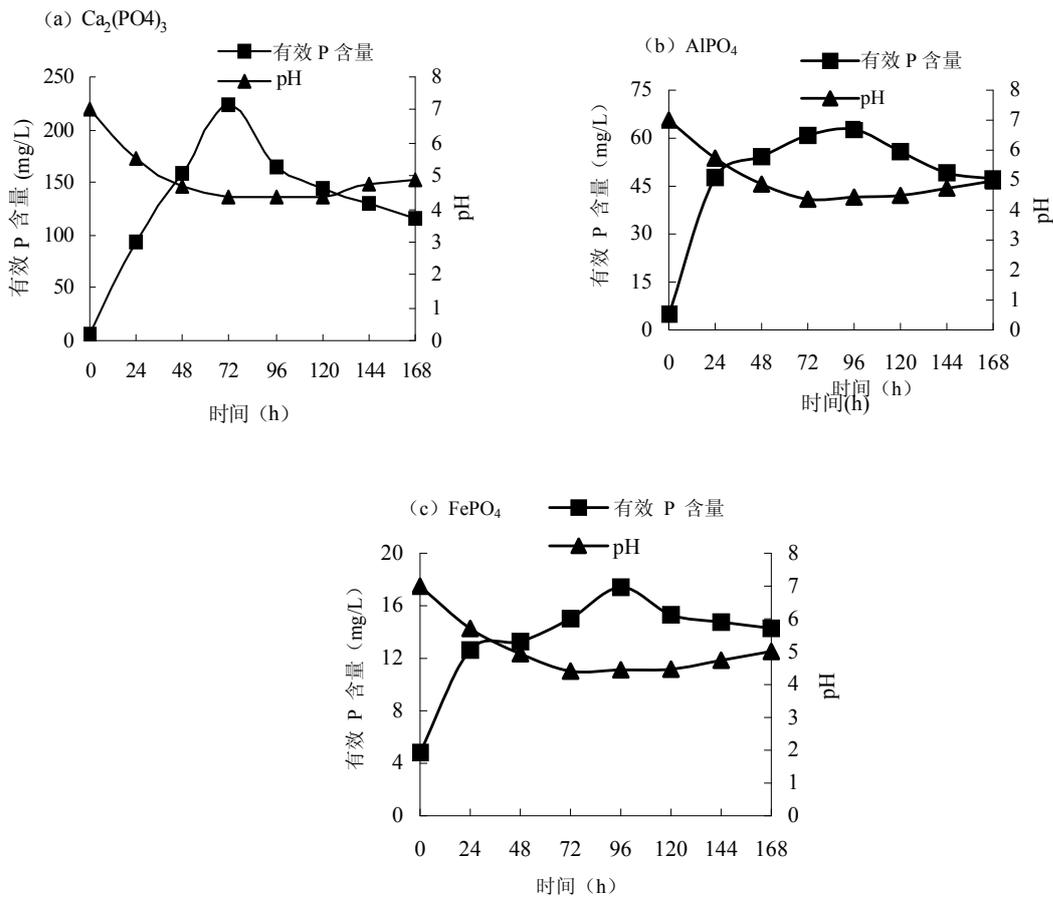


图 1 溶磷菌 GJT-1 在不同磷酸盐发酵液中的溶 P 能力和 pH 的变化

Fig. 1 Changes in phosphate released and pH over time during phosphobacterium GJT-1 solubilisation of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, AlPO_4 and FePO_4

中菌株 GJT-1 溶解 3 种难溶性磷酸盐能力由大到小依次为：磷酸三钙>磷酸铝>磷酸铁，在发酵过程中随着溶 P 量的增加，pH 值均下降 2~3 个单位。许多研究结果表明，溶磷菌对难溶无机磷酸盐的溶 P 机理之一是菌体生长过程中分泌乳酸、葡萄糖酸、柠檬酸、丙酸、丁二酸等多种有机酸，使发酵液中 pH 值降低，而将其中的 P 溶解释放出来^[19-21]。本试验的结果也证实磷细菌 GJT-1 溶 P 能力与 pH 值呈相关性。

2.3 菌株 GJT-1 对磷矿粉的溶磷能力

与加空白培养基、接灭活菌液相比，接种溶磷菌 GJT-1 后，以来源于湖北宜昌、贵州开阳的磷矿粉为唯一 P 源的发酵液中有有效 P 含量均有增加，如表 2 所示，培养 14 天后溶 P 量分别为 120.59 mg/L、194.25 mg/L。可见菌株 GJT-1 能够有效地溶解、转化磷矿粉中的难溶性 P。实验发现接种灭活菌液的发酵液中有有效 P 含量比对照要高，说明灭活菌液中可能存在难挥发性有机酸、激素、维生素等，促进 P 的释放，使发

酵液有效 P 含量增加。

表 2 GJT-1 菌株对各种磷矿粉的溶 P 能力

Table 2 P-solubilizing capacities of GJT-1 on phosphorite powders

磷矿粉	各处理滤液有效 P 含量 (mg/L)		
	加培养基	接灭活菌	接活菌
宜昌磷矿粉	39.40	82.65	120.59
开阳磷矿粉	91.74	147.31	194.25

属于沉积岩型磷块岩^[22]的开阳矿粉适于假单胞菌 GJT-1 生长及有效代谢产物的产生，从而易受侵蚀。将经过菌株 GJT-1 作用 14 天的磷矿粉进行扫描电镜观察，如图 2 所示。与原样相比，加空白培养液、接灭活菌液及活菌液处理的磷矿粉表面结果均有差别。接空白培养液，经过 14 天摇床振荡培养，由于其中含有大量阴阳离子，可以与磷矿粉表面的离子进行交换，使得磷矿粉表面部分结构变化。

接灭活菌液处理与加空白培养液处理在电镜照片上差异显著,表明菌株作用于开阳磷矿粉的部分有效成分经灭活后仍然起作用。接活菌液,可见磷矿粉表

面有菌体附着,磷矿粉表面凹凸不平并有絮状物质产生,表明菌株 GJT-1 积聚并在磷矿粉上生存、繁殖,利用了部分难溶 P。

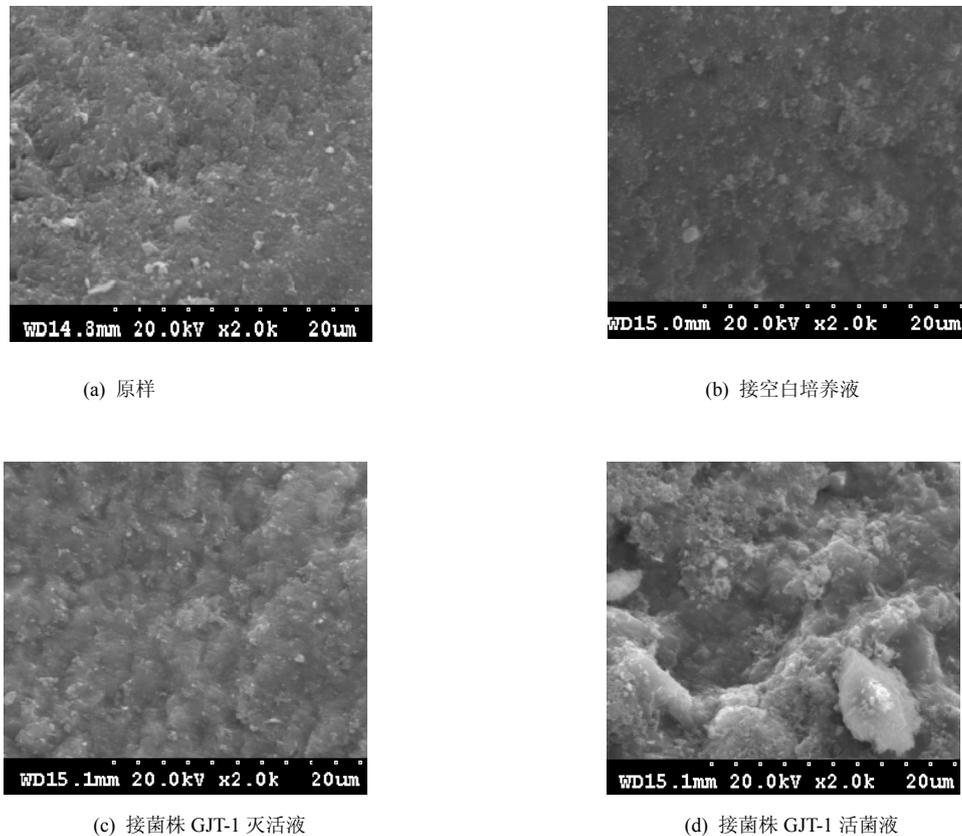


图 2 开阳磷矿粉经处理后的扫描电镜图

Fig. 2 SEM images of the surfaces of Kaiyang phosphorite powders after treatment

2.4 菌种鉴定

菌株 GJT-1 为短杆状, $0.7 \sim 1.2 \mu\text{m} \times 1.2 \sim 2.5 \mu\text{m}$, 革兰氏染色阴性, 不产芽孢, 能运动, 有数根极生鞭毛, 在 LB 平板上 30°C 培养 12 h, 菌落白色、圆形、光滑、不透明。菌株 GJT-1 的生理生化性质: V.P 反应、吲哚反应、甲基红反应、明胶液化、淀粉水解均呈阴性, 氧化酶反应、接触酶、脲酶反应呈阳性, 能发酵葡萄糖、果糖产气。

以菌株 GJT-1 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。菌株 GJT-1 的 16S rDNA 序列 Genebank 登录号为 FJ426594。根据 Genebank 序列同源性比较, 菌株 GJT-1 与 *Pseudomonas azotoformans* (GenBank 登录号为 D84009) 同源性为 99.5%, 与 *Pseudomonas cedrina* (GenBank 登录号为 AF064461) 同源性为

99.4%, 与 *Pseudomonas libanensis* (GenBank 登录号为 AF057645) 同源性为 99.4%, 再结合生理生化特性结果, 可将该菌鉴定为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), 菌株 GJT-1 的聚类树状图见图 3。

3 结论

从作物根际土壤样品中分离到高效溶磷菌 GJT-1。菌株 GJT-1 在分离固体培养基上, 生长至第 4 天时溶 P 圈直径/菌落直径 (D/d) 为 3.71, 在筛选液体培养基上生长至第 3 天时溶 P 量可达 224.51 mg/L, 溶 P 能力强。

在液体摇瓶中菌株 GJT-1 溶解 3 种难溶性磷酸盐能力由大到小依次为: 磷酸三钙 > 磷酸铝 > 磷酸铁, 在发酵过程中随着溶 P 量的增加, pH 值均下降 2~3 个单位, 表明菌株 GJT-1 溶 P 能力与 pH 值呈相关性。

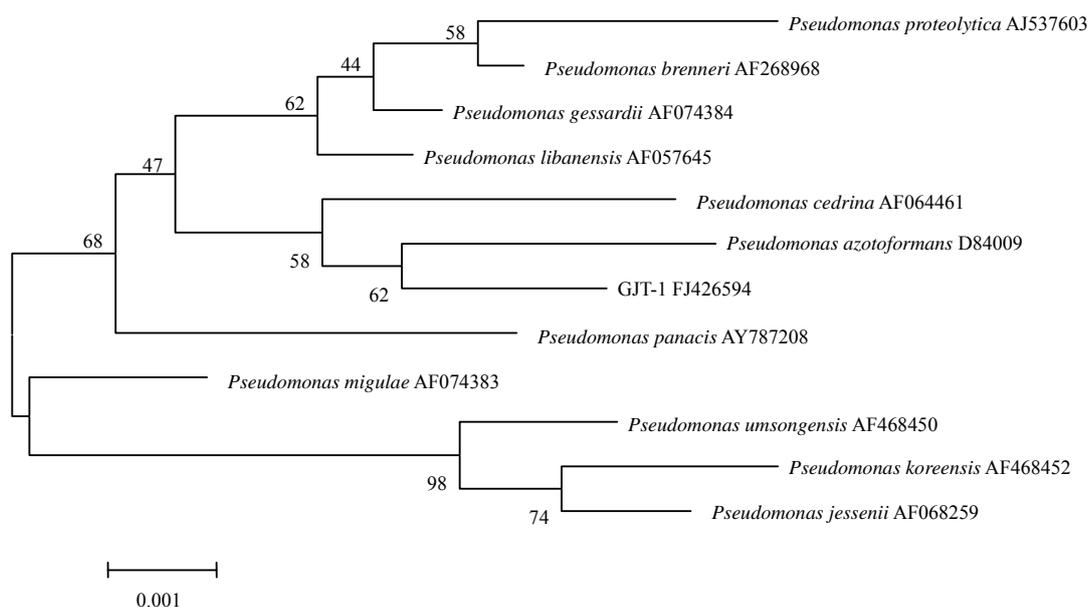


图3 基于16S rDNA序列同源性构建的聚类树状图

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences homology (Evolutionary distances showed in figure were calculated by MEGA 3.0; Bootstrap =1000.Bar, 0.001 substitution per nucleotide)

菌株 GJT-1 对开阳磷矿粉和宜昌磷矿粉的溶 P 量分别为 194.25 mg/L 和 120.59 mg/L。通过扫描电镜观察到接种活菌处理的磷矿粉表面凹凸且有菌体和黏性物质附着,表明菌株 GJT-1 可利用磷矿粉。结合生理生化指标和 16S rDNA 序列分析鉴定菌株 GJT-1 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.)。

菌株 GJT-1 作为高效溶磷菌株,有待通过小区和大田试验以确定菌株 GJT-1 的田间应用效果。

参考文献:

- [1] 陆景陵. 植物营养学(上). 北京: 北京农业大学出版社, 1994
- [2] 张宝贵, 李贵桐. 土壤生物在土壤磷有效化中的作用. 土壤学报, 1998, 35(1): 102-111
- [3] 冯瑞章, 冯月红, 姚拓, 龙瑞军, 康爱明. 春小麦和苜蓿根际溶磷菌筛选及其溶磷能力测定. 甘肃农业大学学报, 2005, 40(5): 604-608
- [4] 尹瑞龄. 我国旱地土壤的溶磷微生物. 土壤, 1988, 20(5): 243-246
- [5] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料, 2001(3): 7-11
- [6] 刘丽丽, 陈立新, 王广朝, 杨文博. 磷细菌9320-SD的溶磷动力学研究. 南开大学学报, 2002, 35(1): 29-32
- [7] Antoun H, Babana AH. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. Plant Soil. 2006, 287: 51-58
- [8] Hameeda B, Rupela OP, Reddy G, Satyavani K. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). Biology and Fertility of Soils, 2006, 43: 221-227
- [9] Gupta R, Singal R, Shankar A, Kuhad RC, Saxena RK. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. Journal of General and Applied Microbiology. 1994, 40: 255-260
- [10] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. FEMS Microbiology Letters, 1999, 170(1): 265-270
- [11] 南京农业大学主编. 土壤农化分析. 2版. 北京: 农业出版社, 1996
- [12] 鲍士旦. 土壤农化分析. 3版. 北京: 中国农业出版社, 2000
- [13] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001
- [14] Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [15] Jone DL, Darrah PR. Role of root derived organic acids in the mobilization of nutrients from the rhizosphere. Plant Soil, 1994, 166, 247-257
- [16] Kucey RMN. Phosphate-solubilizing bacteria and fungi in

- various cultured and virgin Alberta soils. *Canadian Journal of Soil Science*, 1983, 63: 671-678
- [17] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 微生物溶解磷矿粉能力与 pH 及分泌有机酸的关系. *微生物学杂志*, 2003, 23(3): 5-7
- [18] 黄伟, 黄欠如, 胡锋, 吴洪生, 李辉信. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷能力的比较. *生态与农村环境学报*, 2006, 22(3): 37-40
- [19] Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31(5): 655-665
- [20] Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai WA, Young CC. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 2006, 34(1): 33-41
- [21] 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. *土壤学报*, 2005, 42(2): 286-294
- [22] 李庆逵, 蒋柏藩, 鲁如坤. 中国磷矿的农业利用. 南京: 江苏科学技术出版社, 1992

Studies on Phosphorus Solubilizing Activity of a Strain Isolated from Crop Rhizosphere

SUN Shan, HUANG Xing, FAN Ning-jie, FENG Zhao-zhong, LI Hui-hui, LI Shun-peng

(Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department;
College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Phosphobacterium GJT-1 was isolated from the rhizosphere of crop and was identified as *Pseudomonas* sp., based on its physiological characteristics and 16S rDNA sequence analysis. Phosphate-dissolving activity was measured in solid media as well as in liquid media using different phosphate sources including tricalcium phosphate, aluminium phosphate, ferric phosphate. When phosphobacterium GJT-1 was inoculated into NBRIP liquid culture, the release of maximal available soluble phosphorus reached to 224.51 mg/L after 3 days incubation at 28°C. The strain showed high phosphate-dissolving activity for rock phosphates from Kaiyang in Guizhou Province and Yichang in Hubei Province with the capacity of 194.25 mg and 120.59 mg soluble phosphate respectively per liter medium. SEM study of the phosphorite powders retrieved from the phosphobacterium GJT-1 cultured medium revealed the actual dissolution of phosphate from the mineral surface.

Key words: Phosphate-solubilizing bacteria, *Pseudomonas* sp., Phosphate solubilizing activity, Available phosphorus