

# 一株解磷中度嗜盐菌的分离鉴定及解磷特性分析

向文良<sup>1,2</sup> 冯 玮<sup>1</sup> 郭建华<sup>3</sup> 宋 鹏<sup>1</sup> 汤 科<sup>1</sup> 杨志荣<sup>1\*</sup>

(1. 四川大学生命科学学院 四川 成都 610064)

(2. 西华大学生物工程学院 四川 成都 610039)

(3. 西南大学荣昌校区动物医学系 四川 荣昌 402460)

**摘 要:** 从四川自贡某盐井壁植物根系土壤中分离得到 1 株中度嗜盐解磷菌 QW1011。该菌细胞呈线状, 大小为  $0.8\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ , 革兰氏染色为阳性、最适 NaCl 生长浓度为 10%, NaCl 最高耐受浓度 15%。好氧生长, 酪素水解、硝酸还原和接触酶阴性。菌株的 16S rRNA 基因序列(接受号: EF647207)与 *Bacillus megatherium* ATCC 14581 的 16S rRNA 相似性为 100%, 其 16S-23S rRNA 间区(ISR)的 PCR 扩增片的 PAGE 指纹图谱与参考菌株 *Bacillus megatherium* ATCC 14581 和 *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228 存在较大的差异。基于形态学、生理生化、16S rRNA 及 ISR 的初步分析, 认为中度嗜盐解磷菌 QW1011 为 *Bacillus* 属, 对其系统分类还需结合其它分类学指标做进一步分析。当温度  $24^{\circ}\text{C} \sim 36^{\circ}\text{C}$ , NaCl 浓度 5%~10%, pH 6.5~8.0 培养 60 h 时, 菌株 QW1011 对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  盐培养基都具有较好的解磷能力, 其解磷能力可达  $56.76\ \mu\text{g/mL} \sim 71.34\ \mu\text{g/mL}$ , 且对  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  盐的解磷能力优于卵磷脂的解磷能力。

**关键词:** 中度嗜盐解磷菌, 解磷分析, 表型分析, 16S rRNA 系统发育, 16S-23S rRNA 间区特性

## Identification of a Moderate Halophilic Phosphate-dissolving Bacterium and Its Phosphate-solubility

XIANG Wen-Liang<sup>1,2</sup> FENG Wei<sup>1</sup> GUO Jian-Hua<sup>3</sup> SONG Peng<sup>1</sup> TANG Ke<sup>1</sup>  
YANG Zhi-Rong<sup>1\*</sup>

(1. College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064, China)

(2. College of Bioengineering, Xihua University, Chengdu, Sichuan 610039, China)

(3. Department of Animal Medicine, Xinan University, Rongchang, Sichuan 402460, China)

**Abstract:** A aerobic moderate halophilic phosphate-dissolving bacterium, named QW1011, was isolated from the plant rhizospheres grown on the wall of ancient brine well located in Zigong city, Sichuan Province, China. The results showed that its cell was line shaped ( $0.8\ \mu\text{m} \times 30\ \mu\text{m} \sim 100\ \mu\text{m}$ ), gram positive. The strain required aerobic conditions for growth and grew well with an optimum concentration at 10% NaCl (*W/V*) at pH 7.0 and tolerated up to 15% NaCl. And it could also hydrolyze gelatin and starch but not casein. 16S rRNA analysis revealed that its sequence sharing 100% similarity to *B. Megaterium* ATCC 14581. However, compared with *B. Megaterium* ATCC 14581 and *B. Megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228, QW1011

exhibited several differences in the phenotypic, physiological characteristics and ISR. Based on the phenotypic distinctiveness, molecular and ISR genetic evidence, it was proposed that QW1011 can be classified as genus *Bacillus*. The strain showed high phosphate-dissolving ability for  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  with the capacity of 62.42  $\mu\text{g/mL}$ ~71.34  $\mu\text{g/mL}$  in  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  liquid medium at 24°C~36°C, 5%~10% sodium (*W/V*) and pH 6.5~8.0 after incubation for 60 h. And its activity for  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  was higher than for lecithin.

**Keywords:** Moderate halophilic phosphobacteria, Phosphate-solubility, Phenotypic analysis, 16S rRNA, 16S-23S rRNA ISR

土壤盐渍化是世界上限制农业生产的一个重要环境因素。在我国  $0.67 \times 10^8$  公顷耕地中就有 10% 耕地为盐渍化土壤。开发利用盐渍土壤,使之发挥出生产上的巨大潜力是农业生产上的一个重要课题<sup>[1]</sup>。随着耐盐作物育成和耐盐经济植物的发现,这些作物的营养状况将成为今后发展盐渍化土壤农业必须解决的问题<sup>[2]</sup>。在传统盐渍化农业生产中多施用高水溶性磷肥满足植物对磷的需求,但是磷肥施入土壤后易形成难溶性的磷酸盐并迅速被土壤矿物吸附固定或为微生物固持,其当季利用率仅为 10%~25%<sup>[3]</sup>。因此,单纯依靠施用磷肥来解决盐渍化土壤磷素缺乏,提高作物的单产,不仅会造成粮食的小幅度增产总是伴随着化肥的大量投入,而且还会使得盐碱土壤径流中磷浓度的提高,引起水体的富营养化,导致盐渍化环境严重的次生污染<sup>[2-4]</sup>。因此,寻求溶解盐渍化土壤中作物难以利用磷的途径和方法,提高磷的利用率,对发展盐渍土壤农业和生态系统的恢复,都具有重要的意义。

土壤微生物是土壤养分转化和循环的动力,土壤磷素循环以解磷微生物的生命活动为中心。解磷微生物依靠自身的代谢产物或与其它生物协同将土壤中的难溶无机磷转化成可利用的形态,同时吸附植物根际周围的锌、铜、硒等微量元素,改善植物营养,分泌生长调节物质,促进根系生长等,从而加速土壤中磷速的循环,保证作物正常的生长发育<sup>[5,6]</sup>。因此,解磷微生物的研究一直受到科学家的重视,期望以接种剂的途径提高土壤难溶性磷的有效性和磷肥的利用效率。盐渍化土壤作为一种特殊的盐生环境,分布着各种嗜盐微生物,主要包括于细菌域中,也包括古菌和真菌中的某些类群。这些嗜盐微生物以多种分子机制适应其所处生境<sup>[7]</sup>,并在盐渍化土壤植物的磷吸收中扮演着重要的角色。分离和鉴定这些嗜盐解磷微生物对于解决盐渍地作物磷吸收,发展盐渍地农业具有重要的意义。鉴于此,本研究以自贡古盐井井壁植物根系土壤为研究

对象分离嗜盐解磷细菌,通过形态、生化、16S rRNA 系统发育和 16S-23S rRNA 间区分析对所分离的菌株进行了初步分类并对其解磷特性做了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 参考菌株

参考菌株: *Bacillus megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228、*Bacillus megatherium* ATCC 14581 由本实验室提供。

### 1.2 样品的采集和菌株的分离

采集自贡某古盐井井壁植物根系土壤若干。菌种富集和分离培养参考蒙金娜的解磷菌分离<sup>[2]</sup>和 Ida Romano 等<sup>[8]</sup>关于嗜盐菌的分离方法构建解磷嗜盐菌分离培养基,接入适量样品,30°C、150 r/min 光照富集培养 14 d~30 d 后,平板分离挑选形成透明圈的菌株,纯化后得到 1 株编号 QW1011 的解磷嗜盐菌,4°C 保藏。

无机磷培养基(g/L): 酵母膏(Difco) 10.0 g, Casamino acids (Difco) 7.5 g, 柠檬酸三钠 3.0 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g, KCl 1.0 g,  $\text{FeCl}_2$  0.36 g,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.06 g, NaCl 100 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  10.0 g, 其中 NaCl 配成溶液灭菌后加入,调 pH 7.3,加无菌水至 1000 mL。

有机磷培养基(g/L) 以 2.0 g 卵磷脂代替  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , 灭菌后再加无菌  $\text{CaCO}_3$  5.0 g, 其它同无机磷培养基。

### 1.3 菌种多相分类鉴定

**1.3.1 表型特征鉴定:** 参见 Li 等方法<sup>[9]</sup>, 通过光学显微镜(Olympus microscope BH-2)和扫描电子显微镜(JEOL model JSM5600LV)观察菌体的形态特征。生化特征鉴定参见 Tomlinson 和 Juez 等对嗜盐菌的鉴定方法<sup>[10,11]</sup>。

**1.3.2 16S rRNA 序列及系统发育分析:** 基因组 DNA 的提取和 16S rRNA 的扩增及序列分析参见 Toru Shigematsu<sup>[12]</sup>等方法。引物采用细菌 16S rRNA

PCR 扩增通用引物 *Eu27F* (5'-AGAGTTTGATCMT GGCTCAG-3'; positions 8~27 of *E. coli* 16S rRNA) 和原核微生物特异性引物 1490R (5'-GGTACCTTGTTCGACTT-3'; positions 1491~1509 of *E. coli* 16S rRNA)。PCR 扩增条件: 94°C 变性 1 min, 50°C 退火 45 s, 72°C 延伸 1.5 min, 30 个循环。PCR 产物经 pUC18-T 载体 T-A 克隆入 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 挑选阳性菌落, 提取重组质粒, 采用 Applied Biosystems DNA Sequencer (model 377) 自动进行, 测序引物为 M13F 和 M13R。16S rRNA 序列经校对后与 GenBank 数据做相似性分析。

**1.3.3 16S-23S rRNA 间区 PCR 片段特性分析:** 参见 Jensen 等<sup>[13]</sup>方法 PCR 扩增 QW1011 菌体的 16S-23S rRNA 间区序列(ISR), 引物 G1(5'-GAAGTCGTAACAAGG-3')和 L1(5'-CAAGGCATCCACCGT-3')。其中 G1 高度保守, 紧邻 16S-23S rRNA ISR 的上游 30 bp~40 bp 区域; L1 为 23S rRNA 的一个保守区域, 位于 16S-23S rRNA ISR 下游 20 bp 区域。PCR 扩增条件: 94°C 变性 1 min, 55°C 退火 2 min, 72°C 延伸 3 min, 25 个循环。ISR-PCR 产物经 PAGE 电泳分析其特性。

## 1.4 解磷特性分析

**1.4.1 细菌解磷能力测定:** 待测菌株分别等量接种于装有 100 mL 含磷液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 于 30°C、200 r/min 振荡培养 60 h 后测定有效磷的含量, 分别考察菌株对有机磷(卵磷脂)和无机磷  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的解磷能力大小, 并进一步考察初始 pH、温度和 NaCl 含量对菌株溶解无机磷  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  的影响<sup>[2]</sup>。对照组接种相同量的灭活菌体, 在相同条件下培养。

**1.4.2 测定方法:** 取 10 mL 培养液, 5000 r/min 离心 15 min, 消解上清后取 5 mL 液体定容至 10 mL, 利用钼蓝比色法测定过滤液的有效磷浓度; 沉淀加 1 g 石英砂在研钵中研磨 10 min 后用蒸馏水洗涤, 研磨液 5000 r/min 再离心 20 min, 弃去沉淀, 将上清液定容为 10 mL, 采用同样的方法测定菌体和残渣中有效磷的含量<sup>[2]</sup>。二者之和表征有效磷含量。

## 2 结果

### 2.1 形态学特征

菌株 QW10-11 在嗜盐解磷培养基上培养 48 h 后可形成较大菌落。菌落浅黄色、圆形, 表面光滑、

凸起, 呈半固体膏脂状, 不易挑起, 不产生色素, 边缘整齐, 周围有明显的亮斑。菌体细胞不运动, 细胞成长杆状, 排列成线性, 大小约 0.8  $\mu\text{m}$ ×30  $\mu\text{m}$ ~100  $\mu\text{m}$ , 革兰氏染色阳性, 芽孢圆形。其扫描电子显微镜形态如图 1。

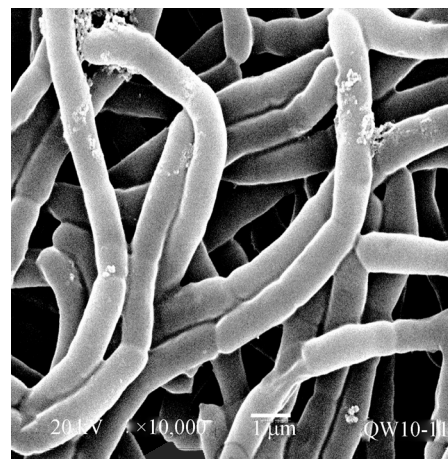


图 1 菌株 QW1011 在扫描电镜( $\times 10000$ )下的细胞形态

Fig. 1 Cell morphology of strain QW1011 under scanning electron microscopy ( $\times 10000$ )

### 2.2 生理生化特征

菌株 QW1011 严格好氧生长, 能利用多种有机物作碳源; 最适生长温度 30°C, NaCl 生长范围 2%~15%, 最适 NaCl 生长浓度 10%。牛奶酪化、明胶液化、淀粉水解、糖产酸、氧化酶呈阳性; 酪素水解和硝酸还原、接触酶呈阴性(表 1)。其生化特征相似于菌株 *B. Megaterium* ATCC 14581 和 *B. Megatherium* var. *phosphaticum* DSM3228。

### 2.3 16S rRNA 序列分析

菌株 QW1011 的部分 16S rRNA 基因序列经验证后与 GenBank 中相关序列 Blast 比较, 与 *Bacillus megaterium* ATCC 14581 菌株的 16S rRNA 序列同源性为 100%, 其 16S rRNA 序列在 GenBank 数据库中接受号为 EF647207。

### 2.4 16S-23S rRNA 间区特性分析

由于菌株 QW1011 在生理特征上相似于 *B. Megaterium* ATCC 14581 和 *B. Megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228, 而在形态上却与之存在较大的差异。因此, 选用 *B. Megaterium* ATCC 14581 和 *B. Megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228 作参考菌株, 进一步分析菌株 QW1011 的 16S-23S rRNA

表 1 菌株 QW1011 与 *B. Megaterium* ATCC 14581 和 *B. Megatherium* var. *phosphaticum* DSM3228 主要形态的和生理特征

Table 1 List of some morphological and physiological properties of stain QW1011, *B. Megaterium* ATCC 14581 and *B. Megatherium* var. *phosphaticum* No. 2

Phenotypic characters	ATCC 14581	DSM3228	QW1011
Colony pigmentation	Pale	Pale	Buff
Cell morphology	Ellipse	Ellipse	Line
Cell arrangement	Short chain	Single, pairs	Line
Cell size (μm)	1.2 ~ 1.5×2.0 ~ 5.0	1.8×2.6 ~ 6.0	0.8×30 ~ 100
Gram staining	+	+	+
Motility	+	+	—
Spore formation	Ellipse	Ellipse	Round
Aerobic growth	+	+	+
Anaerobic growth	+	—	—
Milk peptonization	—	+	+
Gelatin hydrolysis	+	+	+
Casein hydrolysis	+	+	—
Starch hydrolysis	+	+	+
Acids from sucrose	+	+	+
Reduction of nitrate	+	+	—
Catalase	+	—	—
Oxidase	+	+	+
Optimum NaCl	N	N	10%
NaCl tolerance	7%	5%	15%

注：—: Negative; +: Position; N: Not test.

间区特性，其 ISR-PCR 扩增片段的 PAGE 指纹图谱 (图 2)表明：菌株 *B. megaterium* ATCC 14581、*B. megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228 和 QW1011 的 ISR 的 PCR 扩增片段表现出了明显的差异。其中 *B. megaterium* ATCC 14581 和 *B. megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228 的 ISR-PCR 的扩增片段的 PAGE 电泳表现一致，因而在 ISR 水平上 ATCC 14581 和 DSM 3228 表现出极大的相似性。而菌株 QW1011 只出现了两条条带，分别位于 350 bp 和 450 bp，与参考菌株相比差异较大。因而，菌株 QW1011 和菌株 *B. megaterium* ATCC 14581 尽管在 16S rRNA 水平上相似性达到 100%，但其在 16S-23S rRNA 分子水平上已经存在了分化。

2.5 解磷特性分析

2.5.1 无机磷和有机磷的解磷能力及解磷时间分析：以无机磷和有机磷培养基作空白，分别向以  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  和卵磷脂作唯一磷源的发酵培养基中接入 QW1011，探讨菌株 QW1011 对无机磷和有机磷的解磷能力，其测定结果见表 2。结果表明：在无机磷解磷实验中，接菌处理培养液以及菌体和残渣中水溶性磷总量达 77.53  $\mu\text{g/mL}$ ，比对照增加了 13.0 倍；而有机磷解磷仅增加了 5.73 倍。说明菌株 QW1011 对无机磷的解磷能力大于有机磷解磷。目前，普遍

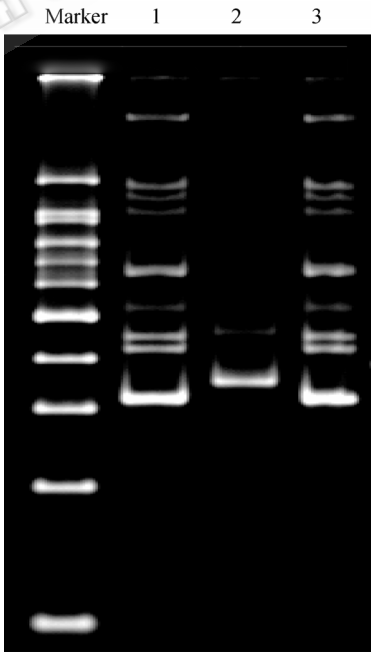


图 2 QW1011、*B. megaterium*(ATCC 14581)和 *B. megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228 的 ISR PCR 扩增片段的 PAGE 指纹图谱

Fig. 2 PAGE profiles of ISR-PCR patterns of *B. megaterium* ATCC 14581, QW1011 and *B. megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228

注：1：100 bp 梯度 marker；2：*B. Megaterium* ATCC 14581；3：菌株 QW1011；4：*B. Megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228.

Note: 1：100 bp ladder size marker (small strand 200 bp, Invitrogen); 2：*B. megaterium* ATCC 14581; 3：QW1011; 4：*B. megatherium* var. *phosphaticum* DSM 3228.

表 2 QW1011 解磷能力检测结果(μg/mL)  
Table 2 P-solubilizing ability of QW1011 (μg/mL)

检测项目 Test parameters	无机磷解磷能力[Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ] Solubilization of Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>		有机磷解磷能力(卵磷脂) Solubilization of lecithin	
	无机磷(空白) Control	无机磷发酵 Solubilizing	有机磷(空白) Control	有机磷发酵 Solubilizing
pH 值 pH value	6.3	4.8	6.3	7.4
发酵液中有有效磷含量 Available P in the liquid medium	4.6	71.31	0.62	3.34
菌体或残渣中有有效磷含量 Available P in medium residue	1.36	6.22	1.03	6.12
有效磷总含量 Total available P	5.96	77.53	1.65	9.46
比空白增加倍数 Solubilizing effect (time)	0	13.0	0	5.73

认为磷细菌对难溶无机磷酸盐的解磷是菌体生长过程中产生各种有机酸而将其中的磷释放出来,即“酸解作用”<sup>[2,14]</sup>;对有机磷的解磷机理主要是细菌产生的酶的作用,即“酶解作用”<sup>[2,14]</sup>。实验中无机磷解磷后培养基 pH 值为 4.8,相比于对照(pH 值 7.4)发酵液呈酸性的结果也证实了这一观点。有机磷培养基解磷液的 pH 值高于对照,其释放的水溶性磷显然不是酸的作用,其 pH 值升高的原因可能是磷细菌产生的酶作用于卵磷脂产生胆碱的影响。进一步考察菌株 QW1011 对无机磷和有机磷解磷时间表明(图 3):菌株对 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的解磷能力明显高于对卵磷脂的解磷能力。对其磷的释放分别在解磷 60 h 和第 36 小时时基本达最大值,以后渐达平衡;在有机解磷实验中,QW1011 的延滞期明显长于无机磷的解磷。究其根本是早期磷源的受限影响了菌体的初期生长与增殖。在低初始有效浓度的有机培养基中,可能接种的磷细菌感受到了低磷胁迫,菌体经历一系列的适应和代谢合成酶作用于卵磷脂所需的时间大于对无机磷的酸解作用时间。

**2.5.2 pH 值对无机磷解磷分析:**许多研究者认为:溶磷与培养介质的 pH 之间没有必然关系<sup>[15,16]</sup>,但也有报道二者之间存在显著的相关性, Illmer 和 Schinner 甚至认为对于 *Penicillium aurantiogriseum* 和 *Pseudomonas* sp. (PI18/89)的溶磷作用主要是由于产生质子的酸解作用<sup>[17]</sup>。研究中发现(图 4):在 pH 值低于 5.8 时,溶液当中的有效磷主要是发酵液中的初始 pH 对 Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 的溶磷作用,在观察中也发现菌体在此时长势极差;当初始 pH 值高于 5.8 时,

菌体生长,菌体产酸溶磷;在 pH 6.5~8.0 菌体长势良好,溶液中的有效磷主要来自于菌体的代谢

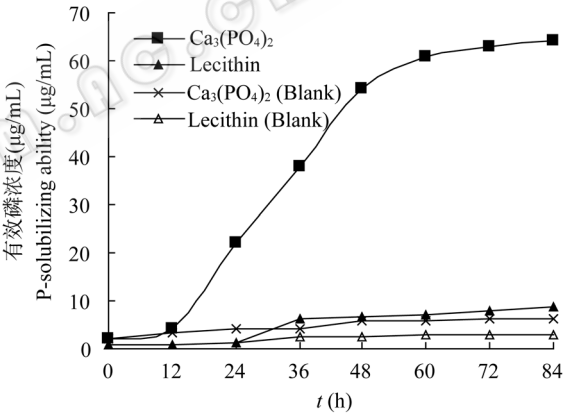


图 3 解磷时间对解磷的影响  
Fig.3 Relationship between functional time and available P

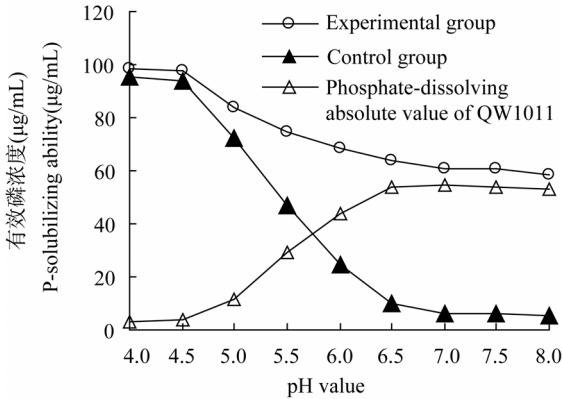


图 4 解磷初始 pH 值对解磷的影响  
Fig.4 Relationship between pH and available P

产酸的溶磷作用,在此阶段发酵液终了的pH为4.8。因此,研究认为菌株 QW1011 的溶磷作用主要来自于菌体代谢产生质子的酸解作用。

**2.5.3 温度对无机磷解磷分析:**菌株 QW1011 的最适生长温度为 30℃,在 24℃~36℃ 的解磷实验表明(图 5):在研究的温度范围内温度对菌株的解磷影响不大,溶液中有效磷的浓度维持在 56.76 μg/mL~71.34 μg/mL。

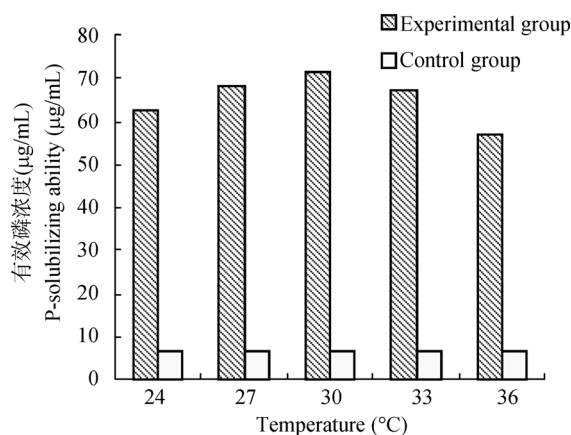


图 5 温度对解磷的影响

Fig. 5 Relationship between temperature and available P

**2.5.4 Na<sup>+</sup>对无机磷解磷分析:**Na<sup>+</sup>对菌株 QW1011 解磷的影响主要表现为渗透压影响菌株生长和代谢,从而影响菌株的产酸溶磷。研究表明(图 6):当 NaCl 浓度在 5%~10%时,菌体解磷能力变化不大,溶液中有效磷浓度维持在 62.36 μg/mL~71.47 μg/mL。当溶液中 NaCl 浓度高于 10%时,由于高深透压的影响菌体的解磷受到极大影响。特别 NaCl 浓度在 15%时,菌体几乎不生长,溶液中有效磷的含量为 10.46 μg/mL,仅比对照 6.14 μg/mL 略高。

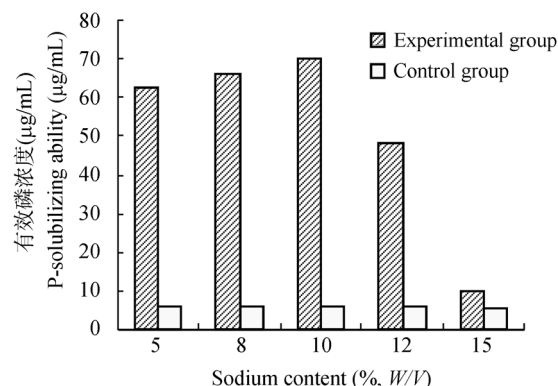


图 6 钠离子浓度对解磷的影响

Fig. 6 Relationship between sodium and available P

### 3 讨论

磷是发展农业生产重要的限制因素,利用微生物活化土壤固化磷,解决磷的缓释是提高作物磷吸收的重要途径<sup>[2,14]</sup>。从 20 世纪初开始,各国学者对解磷菌进行了广泛的研究,筛选出了大量的解磷菌。其中细菌类有: *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Erwinia*、*Agrobacterium*、*Serratia*、*Flavobacterium*、*Enterobacter*、*Micrococcus*、*Azotobacter*、*Bradyrhizobium*、*Salmonella*、*Chromobacterium*、*Alcaligenes*、*Arthrobacter*、*Streptomyces*、*Thiobacillus* 和 *Escherichia*; 真菌类有: *Penicillium*、*Aspergillus*、*Rhizopus*、*Fusarium* 和 *Sclerotium* 等<sup>[18]</sup>。近年来随着耐盐作物育成和耐盐经济植物的先后发现,磷素的吸收成为了发展盐碱地农业的面临的主要问题<sup>[2,4]</sup>。由于目前解磷菌株的盐耐受力普遍不高,对盐碱地溶磷效果差。因此,筛选新的适宜于盐碱地生长的嗜盐解磷微生物成为了发展盐碱地农业解决盐碱植物磷吸收的一项重要任务。国内部分厂家可用在 7% NaCl 中生长的蜡状芽孢杆菌生产解磷微生物肥料用于盐碱化土地作物的生产<sup>[19]</sup>,取得了一定的效果。但蜡状芽孢杆菌的一些菌株可引起食物中毒<sup>[2]</sup>。刘长霞等从海滨盐碱土筛选出 1 株在 10% NaCl 下仍保持较高无机磷解磷的真菌,并研究了其解磷特性<sup>[2]</sup>。然而,目前尚未见有关分离鉴定嗜盐原核解磷微生物有影响的报道。

微生物的分离鉴定是微生物系统学研究的一个重要前提,是微生物研究的基础。近年来,随着其它多学科的发展,特别是分子生物学及基因组学研究成果的应用使原核微生物的分离鉴定发生了研究理念的提升<sup>[20]</sup>。原核生物的分类鉴定从传统的表型鉴定发展到了多相分类(表型、遗传型和系统发育),许多新技术和新方法在细菌的分类学中得到了广泛的应用。但目前还没有一种简便而直接对微生物进行多相分类研究的通则,通常认为在研究未知细菌时 16S rRNA 系统发育信息是最佳的首选<sup>[20]</sup>。16S rRNA 的系统发育是研究微生物相互关系的有效工具,是细菌进化和分类学的重要指标。在系统发育分析中菌株 QW1011 和 *B. megaterium* 聚集成簇,与菌株 *B. megaterium* DSM 3228 都具有 100% 的高似性。因此,在 16S rRNA 进化水平上菌株 QW1011 与 *B. megaterium* 具有较近的亲缘关系。然而,大量

的研究数据表明：对于相近种或同一种内的不同菌株之间的鉴别 16S rRNA 分辨率较差，单纯依靠 16S rRNA 测序绘制的系统发育其可靠性不充分，应当寻找其它更适合的分子<sup>[20,21]</sup>。

16S-23S rRNA 间区近年来在细菌系统发育学，特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面倍受关注。当研究的 16S rRNA 序列高度相似性时，16S-23S rRNA 区间序列特性可以进一步为这些菌株的分类进一步提供分子证据<sup>[21]</sup>。研究认为，16S-23S rRNA 的 ISR 区域包括功能区和非功能区。在进化的过程中，功能区如 tRNA 基因、核糖核酸酶 和 Box A 等相对保守。然而，非功能区由于受到环境的压力经常会受到碱基的插入或缺失突变。因此，Song 等认为对起源相近的菌株，其 ISR 的在进化过程中发生的突变在一定程度上响应了环境的独特性，可以作为菌株的分类信息<sup>[22]</sup>。对 QW1011 的 ISR-PCR 的扩增片段的进一步 PAGE 分析(图 2)表明：尽管 QW1011 在 16S rRNA 水平上与 DSM 3228 相似性达到 100%，但与菌株 ATCC 14581 和 DSM 3228 相比较，其在 ISR 已经在分子水平的发育中出现了分化。

微生物的表型是基因与环境相互作用的外在表现，可以用于区分不同的菌种<sup>[20]</sup>。分离菌株 QW1011 在生化特征(表 1)方面除酪氨酸水解阴性外，其它生化特征基本相似于参考菌株 ATCC 14581 和 DSM 3228。然而进一步形态学研究发现：QW1011 在菌落形态、细胞形态和芽孢的形态等方面都明显异于 ATCC 14581 和 DSM 3228。陶天申等认为：形态学特征依赖于多基因的表达，具有相对稳定性，是原核生物分类和鉴定的重要依据<sup>[20]</sup>，是原核基因组的表型。因此，形态特征的差异在一定程度上也反映了来源于盐生环境的 QW1011 与 ATCC 14581 和 DSM 3228 在内在分子水平上的分化。基于以上分析，我们认为分离自盐生环境的嗜盐解磷菌 QW1011 在分类学上属于 *Bacillus* 属，对其系统学更详细的了解还需结合其它分类方法(如 G+C%、DNA-DNA 杂交等)做进一步分类。

解磷的微生物资源种类繁多，不同的生态系统，由于土壤特性和植被的差异，土壤中解磷的微生物特性可能存在很大的差异。初步研究认为：分离得到的菌株 QW1011 在分类学上属于芽孢杆菌属，在温度 24°C~36°C，NaCl 浓度 5%~10%，pH 6.5~8.0 范

围内都具有较好的解磷能力。对嗜盐解磷菌 QW1011 生物学特性及大田中影响解磷的因素还需进一步研究。目前的研究结果不仅为其进一步研究打下理论基础，而且对于广泛开展筛选适宜于盐碱地使用的解磷微生物，促进我国的盐碱地农业的发展都具有重要的借鉴意义。

## 参 考 文 献

- [1] 陆一鸣, 李彦舫, 曹明富, 等. 短芒大麦耐盐碱新品系的生理生化和分子生物学分析. 中国农业科学, 2002, 35(3): 282-286.
- [2] 刘长霞, 谭天伟, 翟洪杰. 盐碱条件对真菌解磷能力的影响. 微生物学通报, 2003, 30(5): 69-72.
- [3] 张云翼, 邹碧莹. 土壤解磷细菌的研究进展. 现代农业科技, 2008, 15: 182-184.
- [4] 段雪梅, 冯 胜, 王小冬, 等. 一株分离自太湖有机聚集体上的有机磷降解细菌的鉴定及其降解特性研究. 农业环境科学学报, 2008, 27(2): 741-747.
- [5] Luckner R. Relationship between proton extrusion and fluxes of ammonium ions and organic acids in *Penicillium cyclopium*. *Gen Microbiol*, 1984, 130: 1007-1014.
- [6] Kim KY, Jordan D, Donald GA. Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils*, 1988, 26(12): 79-87.
- [7] Ventosa A, Nieto JJ, Oren A. Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1998, 62: 504-544.
- [8] Ida Romano, Assunta Giordano, Licia Lama, et al. *Halo-monas campaniensis* sp. nov., a haloalkaliphilic bacterium isolated from a mineral pool of Campania Region, Italy. *Syst Appl Microbiol*, 2005, 28: 610-618.
- [9] Li WJ, Wang D, Zhang YQ, et al. Two novel species of genus *Kribbella* isolated from soils in Yunnan, China. *Syst Appl Microbiol*, 2007, 29: 29-35.
- [10] Tomlinson GA, Hochstein LL. *Halobacterium sacharovorum* sp. nov., a carbohydrate-metabolizing, extremely halophilic bacterium. *Can J Microbiol*, 1976, 22: 587-591.
- [11] Juez G, Rodriguez-valera F, Ventosa A, et al. *Haloarcula hispanica* sp. nov. and *Haloferax gibbonsii* sp. nov., two new species of extremely halophilic archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol*, 1986, 8: 75-79.
- [12] Toru S, Yueqin T, Hiromi K, et al. Effect of dilution rate on structure of a mesophilic acetate-degrading methanogenic community during continuous cultivation. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 112: 6488-6496.
- [13] Jensen MA, Webster JA, Straus N. Rapid identification of

- bacteria on the basis of polymerase chain reaction amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 945–952.
- [14] 叶国平, 梁锦锋. 解磷细菌(PSB)解磷机理及应用研究进展. *安徽农学通报*, 2007, **13** (9): 53–54.
- [15] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol Biochem*, 1992, **24** (4): 389–395.
- [16] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer. *Soil Biol Biochem*, 2000, **32**: 559–565.
- [17] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. *Soil Biol Biochem*, 1995, **27** (3): 257–263.
- [18] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. *土壤肥料*, 2001, **3**: 7–11.
- [19] 葛 诚. 微生物肥料生产应用基础. 北京: 中国农业科技出版社, 2000, pp.76–82.
- [20] 陶天申, 杨瑞麒, 东秀珠. 原核生物系统学. 北京: 化学工业出版社, 2007, pp.1–114.
- [21] Ruiz A, Poblet A, Mas JM, Guillaumon. Identification of acetic acid bacteria by RFLP of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**: 1981–1987.
- [22] Song Y, Liu C, Molitoris D *et al.* Use of 16S-23S rRNA Spacer-Region (SR)-PCR for identification of intestinal Clostridia. *Syst Appl Microbiol*, 2002, **25**: 528–535.

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的,以微生物学应用基础研究及高新技术创新为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:微生物学、生物工程、病毒学、酶工程、发酵工程、细胞工程等领域的最新研究成果,产业化新技术和新进展。设置的栏目有:研究报告、专论与综述、生物实验室(原技术与方法)、高校教改纵横(原高等院校教学)、精品教学(原名师讲堂)、教学与科研成果展示、显微世界、专题专栏、专家论坛、书讯、会讯等。

### 2 投稿方式

投稿时请登陆我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wwxtbcn>, 点击作者投稿区,第一次投稿请先注册,获得用户名和密码,然后依照提示提交稿件,详见主页“投稿、征稿须知”。

作者必须在网站投.doc 格式的电子稿,图与文字编好页码、图号后合成一个文件上传。凡不符合(投稿须知)要求的人文稿,本部恕不受理。

### 3 写作要求

来稿要求论点明确,数据可靠,简明通顺,重点突出。

#### 3.1 篇幅

以 A4 纸 5 号字计算,综述、教学和方法类文章最好在 3 页以内,研究报告 4~6 页(以上均包括图表)。

#### 3.2 图表

文中的图表须清晰简明,文字叙述应避免与图表重复。所有小图的宽度应小于 8 cm(占半栏),大图的宽度应小于 17 cm(通栏)。

#### 3.3 参考文献及脚注

参考文献按文内引用的先后顺序排序编码,未公开发表的资料请勿引用。我刊的参考文献需要注明著者(文献作者不超过 3 人时全部列出,多于 3 人时列出前 3 人,后加“等”或“*et al.*”,作者姓前、名后,名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名可以缩写,但必须标准,不加缩写点,斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

期刊: [1] 刘 杰, 成子强, 史宣玲. SARS 冠状病毒 *ns*p14 基因的克隆和表达. *微生物学通报*, 2007, **34**(2): 1–3.

[2] Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276**(39): 36514–36519.

图书: [3] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000, p.4.

[4] 董志扬, 张树政, 方宣钧, 等. 海藻的生物合成及抗逆机理. 见: 华 璐等. 核农学进展. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.115–120.

脚注(正文首页下方):

基金项目: ..... 基金资助(No. )

\*通讯作者 Tel: ..... ; Fax: ..... ; E-mail: .....

收稿日期: 2009-00-00 ; 接受日期: 2009-00-00

(下转 p.333)