

研究报告

一株高效解磷肠膜明串珠菌的分离鉴定及解磷能力研究

郭渊 李韵雅 江威 罗权 管政兵 蔡宇杰 廖祥儒*

(江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

摘要:【背景】植物根际土壤含有多种溶磷微生物,但是具有溶磷能力的肠膜明串珠菌未见报道。【目的】从脐橙根际土壤分离高效解磷菌,研究其解磷应用。【方法】通过初筛和复筛从23株菌中筛选解磷能力较强的菌株,同时采用钼蓝比色法测定磷含量。通过测定发酵液中小分子有机酸含量、磷酸酯酶酶活及pH值的变化,探究菌株的解磷机理。【结果】经过筛选得到9株具有一定解磷能力的菌株。通过菌种16S rRNA基因序列分析和生理生化实验确定其中一株菌为肠膜明串珠菌,命名为肠膜明串珠菌G7。培养基初始pH 6.0、碳源为葡萄糖、氮源为硫酸铵时G7的解磷能力较佳。G7发酵过程中产生大量有机酸,而其酸性磷酸酯酶活性高于碱性磷酸酯酶。【结论】碳源、氮源以及初始pH值都能影响G7的解磷能力,其解磷能力主要缘于在发酵过程中产生了大量小分子有机酸,关于G7的解磷机理还需要更深入的研究。

关键词: 解磷菌, 解磷能力, 菌种鉴定, 磷源, 肠膜明串珠菌

Isolation and identification of a phosphate solubilizing bacterium *Leuconostoc mesenteroides* and its ability to dissolve phosphorus

GUO Yuan LI Yun-Ya JIANG Wei LUO Quan GUAN Zheng-Bing

CAI Yu-Jie LIAO Xiang-Ru*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Background] Many microorganisms from plant rhizosphere soil have phosphate solubilizing ability, while phosphate solubilizing *Leuconostoc mesenteroides* have not been reported. [Objective] To isolate and identify efficient phosphate solubilizing bacteria from navel orange rhizosphere soil and investigate the application in phosphorus release. [Methods] Transparent circle assay was used to preliminarily screen the phosphate solubilizing bacteria. After secondary screening, soluble-P in the culture medium was determined by molybdate blue colorimetric method. Different parameters were determined to explore the phosphate solubilizing mechanism of one strain. The phosphate solubilizing mechanism of the strain was explored by measuring the content of low-molecular-weight organic acids in the fermentation broth, the enzyme activity of phosphatase and its pH value. [Results] Nine phosphate solubilizing strains out of 23 candidates were obtained

Foundation item: Prospective Project of Industry, Education and Research of Jiangsu Province (BY2014023-28)

*Corresponding author: Tel: 86-510-85327725; E-mail: liaoxiangru@163.com

Received: November 17, 2017; Accepted: April 24, 2018; Published online (www.cnki.net): May 29, 2018
基金项目: 江苏省产学研前瞻项目(BY2014023-28)

*通信作者: Tel: 86-510-85327725; E-mail: liaoxiangru@163.com

收稿日期: 2017-11-17; 接受日期: 2018-04-24; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-29

after two step selection. Based on 16S rRNA gene sequence analysis and physiological and biochemical characterization, a strain was obtained and named *Leuconostoc mesenteroides* G7. The optimal phosphate solubilizing conditions of the strain G7 were as follows: the initial pH was 6.0, the carbon source was glucose, and the nitrogen source was ammonium sulfate. G7 produced a mass of organic acids, and its acid phosphatase activity was higher than that of alkaline phosphatase. **[Conclusion]** Carbon source, nitrogen source and initial pH can influence the phosphate solubilizing ability of the strain G7. The phosphate solubilizing ability of G7 is mainly due to its large number of low-molecule organic acids produced during fermentation. The mechanism of phosphate solubilizing ability need to be researched thoroughly.

Keywords: Phosphate solubilizing bacteria, Phosphate solubilizing ability, Identification of bacteria, Phosphorus source, *Leuconostoc mesenteroides*

磷元素是植物生长不可或缺的三大营养元素之一^[1],是植物体内很多重要化合物的组成成分,参与细胞的物质代谢、能量代谢、信号传递等^[2],从而影响细胞的增殖和其它生命活动。对植物来说磷元素是仅次于氮元素的第二大营养元素,但是在土壤中磷元素一般以难溶性的无机盐和有机盐存在,造成土壤中磷元素的可利用率较低,很难被植物吸收利用。因此,为弥补我国很多耕地缺磷的情况,只能通过大量施加磷肥以提高作物产量。然而施加的磷肥中能被植物有效利用的较少,大部分被土壤固定或随降雨流失,导致施加磷肥的效果不佳,甚至造成资源浪费和环境污染^[3]。土壤中很多微生物能够分解无机磷和有机磷,提高土壤中游离磷的水平,改善植物的磷营养,从而提高农作物的产量,这类微生物被称作解磷微生物,是一种常见的植物促生菌^[4]。

目前已经报道的溶磷微生物有很多种类,主要包括细菌、真菌、放线菌等,其中细菌主要包括假单胞菌属、芽孢杆菌属、沙门氏菌属、埃希氏菌属等^[5],真菌主要有曲霉属、根霉属、镰刀菌、假丝酵母等,而放线菌主要为链霉菌属。

本研究主要目的是开发优良解磷菌,探究一株从脐橙根际土壤筛选的具有解磷能力的肠膜明串珠菌 G7 其解磷能力和解磷机理,以丰富溶磷微生物的资源。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

普通试剂购买于国药集团,分析试剂购买于

Sigma 公司,细菌 DNA 提取试剂盒购买于北京天恩泽基因有限公司,引物由华大基因公司合成。

PCR 仪, Applied Biosystems 公司;电泳仪,北京六一仪器厂;紫外分光光度计,日立公司;台式高速冷冻离心机,湖南湘仪实验室仪器开发公司;恒温水浴锅和全温度摇瓶柜,江苏太仓市强乐实验设备有限公司。

1.2 土样及培养基

土样采自江西赣州宁都某果园脐橙根际,采集后无菌袋封存,做好标记带回实验室,去除植物残根、石块等杂物,4 °C 保存。

TSB 富集培养基(g/L):胰蛋白胨 15.0,大豆蛋白胨 5.0,氯化钠 5.0。pH 7.2±0.2。

无机磷培养基的配制参照文献[6]。

1.3 方法

1.3.1 菌种筛选

富集:250 mL 三角瓶中加入 50 mL 富集培养基,同时加入玻璃珠,1×10⁵ Pa 高压蒸汽灭菌。称取 5 g 土样加入富集培养基中,30 °C、160 r/min 培养 24 h。

初筛:富集后取样稀释到 10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴、10⁻³、10⁻²,分别取每个稀释度的液体 300 μL 涂布于无机磷固体培养基平板上,倒置于 30 °C 培养箱培养 3-4 d,观察透明圈。挑取有透明圈的菌落反复划线培养^[7]。

复筛:将纯化培养后的菌株接种于含有磷酸三钙无机磷的液体培养基中,30 °C、160 r/min 摇床

培养 6 d。取 2.0 mL 发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用磷钼蓝比色法测定可溶性磷含量^[8]。

可溶性磷含量的测定采用磷钼蓝分光光度法, 原理是磷酸根与钼酸铵在酸性条件下能够生成磷钼酸铵, 而对二苯酚和亚硫酸钠能够将磷钼酸铵还原成蓝色的钼蓝, 用分光光度计在 660 nm 处测定钼蓝的吸光度计算磷含量^[8]。计算公式如下: $X=m \times 10 / 4V$, 式中: X 为发酵液磷含量(mg/L); m 为从标准曲线查得的稀释发酵液中磷含量(mg/L); V 为吸取的稀释后发酵液体积(mL)。

1.3.2 菌种鉴定

(1) 菌种的 16S rRNA 基因序列分析

利用细菌 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA, 采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTAT CCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3') 进行 PCR 扩增^[9]。对扩增后的产物进行琼脂糖凝胶电泳检测, 基因序列由华大基因公司测序。将测序结果在 NCBI 上对比分析^[10]。

(2) G7 菌种的生理生化实验

根据《伯杰细菌鉴定手册》^[11]和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》^[12]对菌株进行生理生化鉴定。

1.4 G7 对不同磷源的分解能力

将保存在甘油管中的 G7 菌株接种于液体 TSB 培养基中 30 °C、100 r/min 培养过夜, 然后取 1 mL 分别接种于 5 种不同磷源(磷酸三钙、磷酸铁、磷酸铝、植酸钙、卵磷脂, 添加量为 0.5%)的无机磷液体培养基中, 每个摇瓶 100 mL, 对照组为不接种培养基, 每组实验 3 个平行。30 °C、100 r/min 培养 6 d, 连续取样测定发酵液中的菌体量、磷含量和 pH 值^[13]。

1.5 初始 pH 值及碳、氮源对 G7 解磷能力的影响

1.5.1 培养基初始 pH 值对 G7 解磷能力的影响

调节磷酸三钙无机磷源液体培养基的初始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, G7 接种后于 30 °C、100 r/min 培养 7 d, 连续取样测定培养液中的菌体量、磷含量以及 pH 值^[14], 以考察

培养基初始 pH 值对菌株溶磷能力的影响。每组实验 3 个平行。

1.5.2 碳、氮源对 G7 解磷能力的影响

将 G7 分别接种于含有不同单一碳源(葡萄糖、蔗糖、果糖、甘露糖、半乳糖, 添加量为 1%)和不同单一氮源(硫酸铵、氯化铵、硝酸钠、硝酸钾, 添加量为 0.05%)的磷酸三钙无机磷源液体培养基中^[7,15], 30 °C、100 r/min 培养 6 d, 测定发酵液中的菌体量、磷含量和 pH 值。每组实验 3 个平行。

1.6 G7 解磷机理的初步研究

1.6.1 发酵液中有机酸的测定

精确称取各种有机酸标准品配制有机酸标样母液, 使用流动相(0.005 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液)配制 100 mL 标准品母液, 使用时取母液进行梯度稀释即可。色谱柱采用 Phenomenex Luna C18 (5 μm, 250 mm×4.6 mm), 柱温为 30 °C, 流动相采用 0.005 mol/L 的 H₂SO₄ 溶液, 流速 0.5 mL/min, 检测波长 210 nm, 进样量 20 μL, 信噪比设为 3。流动相使用前将其用 0.22 μm 孔径的滤膜进行过滤。

将 G7 接种磷酸三钙培养基, 30 °C、100 r/min 培养 7 d, 连续取样测定发酵液中有机酸的含量。取 2.0 mL 发酵液, 在 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 15 min, 吸取 1.0 mL 上清液, 用流动相稀释定容到 25 mL 的容量瓶中, 用 0.22 μm 滤膜过滤, 然后进行液相色谱分析^[16-17]。

1.6.2 发酵液中磷酸酯酶的酶活测定

将 G7 接种磷酸三钙培养基, 30 °C、100 r/min 培养 7 d, 连续取样测定发酵液中磷酸酯酶活性。取发酵好的培养液 2.0 mL, 在 4 °C、6 000 r/min 条件下离心 15 min, 取 0.5 mL 上清液于具塞比色管中, 加入 MUB 缓冲液(酸性磷酸酯酶用 pH 6.5 缓冲液, 碱性磷酸酯酶用 pH 11.0 缓冲液) 4.0 mL, 再加入 1.0 mL 对硝基苯酚磷酸钠溶液, 盖上盖子混匀置于 37 °C 水浴锅 1 h, 加入氯化钙溶液 1.0 mL 和氢氧化钠溶液 4.0 mL 混匀后过滤, 在 400 nm 处测吸光度^[18]。空白对照为不接种的培养液。每个样品测 3 次。

2 结果与分析

2.1 菌种筛选鉴定

2.1.1 初筛

利用磷酸三钙无机磷固体培养基从柑橘根际土壤中筛选到具有溶磷圈的 23 株菌。将这 23 株菌纯化培养后,继续接种于磷酸三钙无机磷平板,得到具有明显溶磷圈的菌株 17 株,其他菌株溶磷圈不明显。在这 17 株菌当中进一步挑选出 9 株具有较大且稳定透明圈的菌株。典型透明圈如图 1 所示。从表 1 中可以看出,初筛的 9 株菌当中有 4 株菌的透明圈直径超过 1.0 cm,分别为 G1、G3、G4、G7,其中 G4 的透明圈直径最大,达到 1.51 cm。其他菌株在磷酸三钙无机磷平板中都有溶磷圈,但是相比这 4 株菌的透明圈较小。

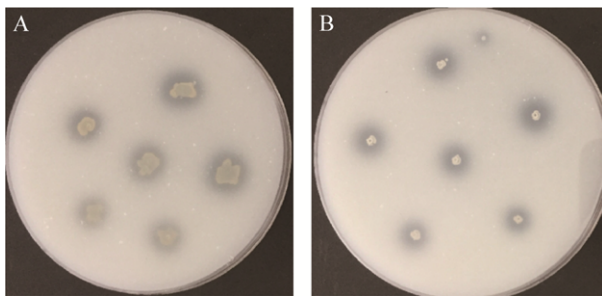


图 1 G4 (A)与 G7 (B)典型透明圈

Figure 1 Typical transparent circle of G4 (A) and G7 (B)

表 1 不同菌株在磷酸三钙平板中的透明圈直径

Table 1 The transparent circle diameter of different strains on $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ agar medium

Strains	Diameter of transparent circle (cm)	Standard error
G1	1.26	0.094 5
G2	0.82	0.172 1
G3	1.13	0.141 7
G4	1.51	0.155 2
G5	0.73	0.120 9
G6	0.89	0.060 3
G7	1.14	0.075 5
G8	0.79	0.141 1
G9	0.69	0.085 0

2.1.2 复筛

通过摇瓶复筛(图 2),发现有 2 株菌 G4 和 G7 对无机磷酸三钙的分解能力强于其他菌株,解磷量均达到 290 mg/L 以上,G4 的解磷量最高,超过 320 mg/L;G1 和 G3 对磷酸三钙的分解能力也较强,G3 在第 6 天时解磷量超过 270 mg/L,而 G1 在第 6 天时解磷量超过 260 mg/L,所以 G1 和 G3 也具有较强的解磷能力;其他菌株对磷酸三钙也具有一定的分解能力,但是弱于这 4 株菌。通过以上分析得出,初筛得到的 9 株菌对磷酸三钙都有一定的分解能力,其中 G1、G3、G4、G7 对磷酸三钙的分解能力较强,而 G4 解磷效果最佳。

2.1.3 菌种的鉴定

(1) 16S rRNA 基因序列分析

通过 16S rRNA 基因序列分析,能够确定 9 株菌主要属于 4 个菌属,分别是假单胞菌属、芽孢杆菌属、沙雷氏菌属和明串珠菌属。G1、G3、G6、G8 属于芽孢杆菌属,G2、G4、G5 属于假单胞菌属,G7 属于明串珠菌属,G9 属于沙雷氏菌属(表 2)。

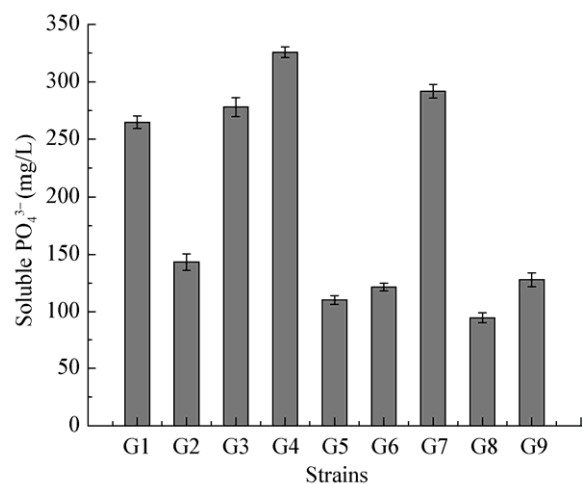


图 2 9 株菌的解磷量

Figure 2 Phosphate solubilization of the 9 strains

表 2 解磷细菌 16S rRNA 基因序列的 BLAST 检索结果

Table 2 BLAST search results for the 16S rRNA gene sequence of different phosphate-solubilizing bacteria

Strains	Genus	Max score	Total score	Query cover (%)	E value	Identity (%)	Accession No.
G1	<i>Bacillus</i> sp.	2 606	2 606	100	0	100	KX783554.1
G2	<i>Pseudomonas</i> sp.	2 543	17 757	100	0	99	CP023048.1
G3	<i>Bacillus</i> sp.	2 615	2 615	99	0	100	KF933674.1
G4	<i>Pseudomonas</i> sp.	2 555	2 555	100	0	100	KY524298.1
G5	<i>Pseudomonas</i> sp.	2 555	2 555	100	0	100	KU977136.1
G6	<i>Bacillus</i> sp.	2 617	2 617	100	0	100	KF936171.1
G7	<i>Leuconostoc</i> sp.	2 534	2 534	100	0	100	LC119126.1
G8	<i>Bacillus</i> sp.	2 248	2 248	100	0	100	KY773579.1
G9	<i>Serratia</i> sp.	2 534	2 534	100	0	100	KF737363.1

(2) G7 的生理生化实验

由于目前关于肠膜明串珠菌的解磷能力尚未见报道, 所以选择 G7 作为进一步探究的菌株, 依据《伯杰细菌鉴定手册》和《乳酸细菌分类鉴定及实验方法》对 G7 进行生理生化实验, 结果如表 3 所示。综合 G7 的生理生化实验结果, 对照《伯杰细菌鉴定手册》(第 8 版)和《乳酸细菌分类鉴定及

实验方法》的描述, 鉴定 G7 为肠膜明串珠菌, 并可归于肠膜明串珠菌肠膜亚种^[17]。

2.2 G7 对不同磷源的分解能力

选择 5 种难溶性磷酸盐作为 G7 发酵的磷源, 通过分析发酵后培养液中菌体量、pH 变化、解磷量, 掌握 G7 的解磷能力和生长情况。解磷量和 pH 变化见图 3, 菌体动态见图 4。从图 3 可知 G7 对这

表 3 G7 生理生化实验结果

Table 3 Physiological and biochemical experiments of G7

Experimental items	Experimental results	Experimental items	Experimental results
革兰氏染色	+	葡萄糖产酸	+
Gram stain		Glucose production acid	
37 °C 生长实验	+	产气	+
37 °C Growth		Production gas	
2 °C 生长实验	+	蔗糖	+
Growth at 2 °C		Sucrose	
运动性实验	-	果糖	+
Movement		Fructose	
接触酶实验	-	甘露糖	+
Catalase test test		Mannose	
过氧化氢实验	-	木糖	+
Hydrogen peroxide test		Xylose	
明胶液化实验	-	甘露醇	+
Gelatin liquefaction test		Mannitol	
石蕊牛奶实验	-	半乳糖	+
Litmus milk test		Galactose	
精氨酸分解实验	+	乳糖	+
Decomposition arginine test		Lactose	
柠檬酸利用实验	+	麦芽糖	+
Using citric acid test		Maltose	
七叶苷水解实验	+	阿拉伯糖	+
Esculin hydrolysis test		Arabic candy	
葡聚糖生成实验	+	海藻糖	+
Dextran production test		Trehalose	

Note: +: Positive; -: Negative.

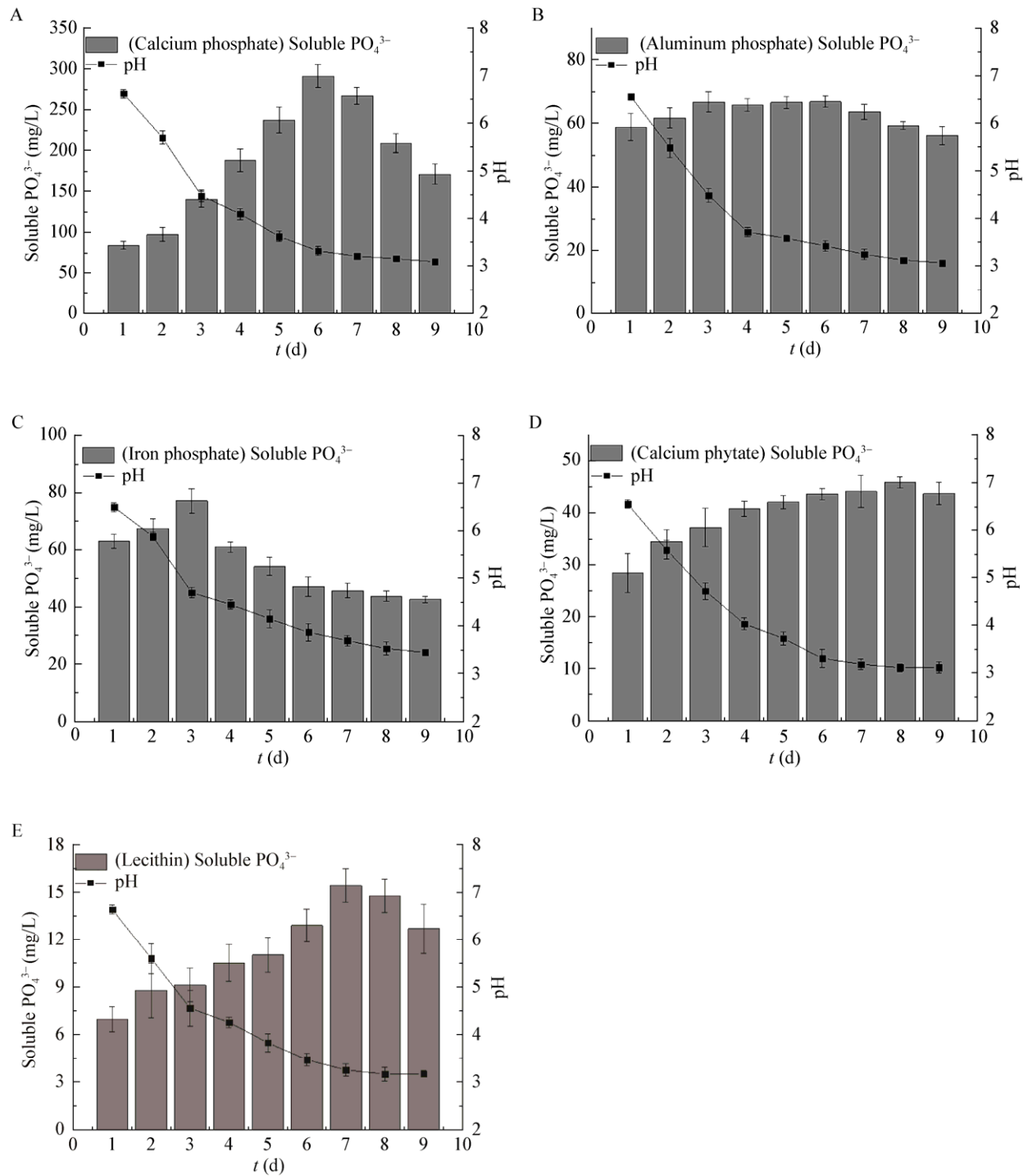


图3 G7对5种不同磷源的分解能力

Figure 3 Ability to dissolve five different phosphorus sources of G7

注: A: G7对磷酸三钙的分解情况; B: G7对磷酸铝的分解情况; C: G7对磷酸铁的分解情况; D: G7对植酸钙的分解情况; E: G7对卵磷脂的分解情况.

Note: A: Solubilization of calcium phosphate by G7; B: Solubilization of aluminum phosphate by G7; C: Solubilization of iron phosphate by G7; D: Solubilization of calcium phytate by G7; E: Solubilization of lecithin by G7.

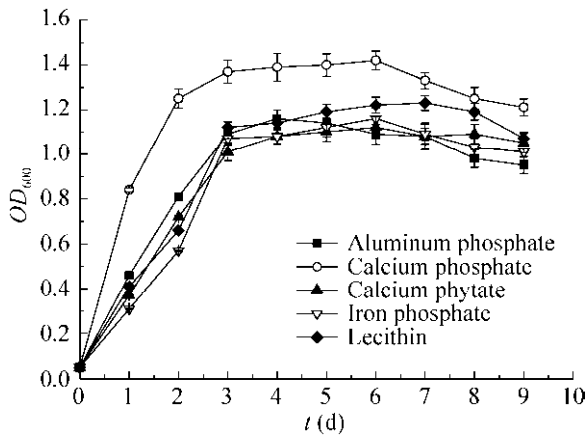


图4 不同磷源培养基中 G7 的生长动态

Figure 4 Growth dynamics of G7 in different phosphorus sources

5种难溶性磷源都具有分解能力,但是对不同磷源的分解能力差异较大,G7对磷酸三钙的分解能力最强,远远强于对其他磷源的分解。不同的培养时间也对G7的解磷量有较大影响。培养3-7 d时,G7对于磷酸三钙的分解能力较强,第1天和第2天G7对磷酸三钙分解较弱,第7天之后G7的解磷量开始下降。G7对磷酸铝的分解较弱,在整个发酵过程中的表现一直比较平稳。G7对于磷酸铁的分解在前3天较强,第2天达到最强,第4天开始下降。G7对植酸钙的分解是随培养时间的增加而增强的,培养时间越长越有利于G7对植酸钙的分解。G7对于卵磷脂的分

解在前3天较弱,第4天开始增强,但是到第7天开始降低。依据pH值变化结果来看,G7的不同磷源发酵液pH值都趋于降低,当难溶性磷酸铝为磷源时,pH值下降得最快,第4天时降到了pH 3.8,其他磷源的发酵液中pH也是持续降低。初步分析认为pH的降低可能对于G7的解磷能力影响不大,因为不同磷源发酵液pH降低的趋势相差不大,但是G7对不同磷源的分解能力却相差很大。从图4可以看出,不同磷源对G7的生长有着不同的影响。在磷酸三钙培养基中G7生长最好,在其他磷源培养基中G7生长较弱。几种不同磷源的培养基中G7大约都在第3天进入对数期,在第7天进入衰退期。G7的最强解磷能力在第3-7天之间。

2.3 初始pH值和碳、氮源对G7解磷能力的影响

2.3.1 初始pH值对G7解磷能力的影响

由图5可知,不同的初始pH值下G7都能够分解磷酸三钙,但是不同的初始pH值对G7的解磷能力影响较大。初始pH 6.0时G7对磷酸三钙分解能力最强。初始pH值高于7.0或者低于5.0时,G7对磷酸三钙的分解较弱。

由图6可知,不同的初始pH值下G7的生长不同,初始pH 6.0时G7的菌体量最高,初始pH 3.0和pH 9.0时G7的菌体量非常小。结果说明,过高或者过低的初始pH值都不利于G7的解磷和生长。

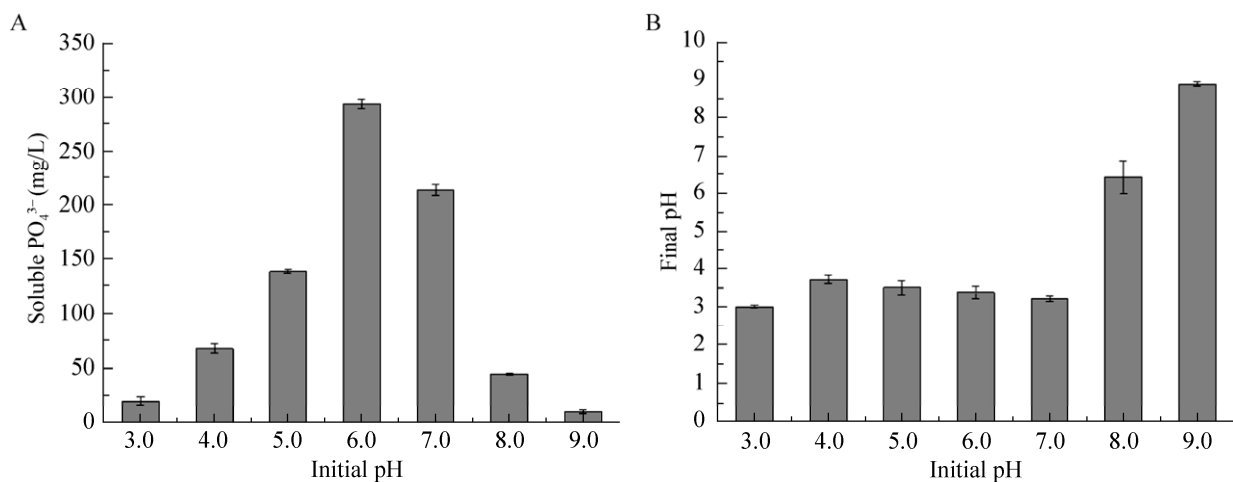


图5 不同初始pH值对G7解磷量(A)和最终pH值(B)的影响

Figure 5 The effect of different culture initial pH on G7 phosphate-solubilizing quantity (A) and final pH value (B)

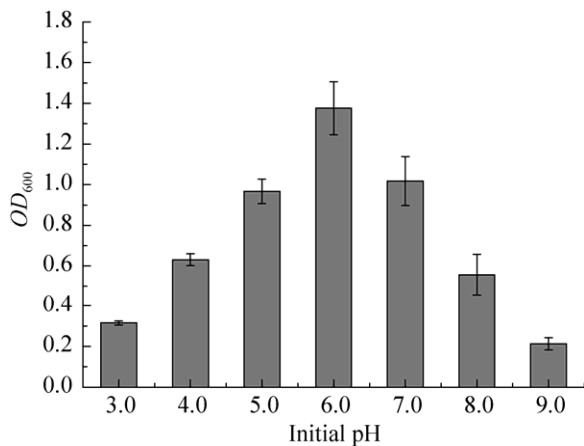


图6 不同初始 pH 值对 G7 菌体量的影响
Figure 6 The effect of different culture initial pH on G7 biomass

2.3.2 碳、氮源对 G7 解磷能力的影响

由图 7A 可知不同碳源对 G7 的解磷能力有着不同的影响。葡萄糖、蔗糖、半乳糖为培养基碳源时，G7 对磷酸三钙的分解能力较强；果糖和甘露糖为碳源时，G7 对磷酸三钙的分解能力非常弱；葡萄糖为碳源时 G7 对磷酸三钙的分解能力最强，甘露糖为碳源时 G7 对磷酸钙的分解能力最弱。同时由图 7B 可知，氮源为硫酸铵时 G7 对磷酸三钙的分解能力最强，硝酸钾为氮源时 G7 对磷酸三钙的分解能力最弱，而且铵态氮比硝态氮更有利于 G7 的解磷能力。

由图 8 可知，不同碳源对 G7 的生长影响不同，

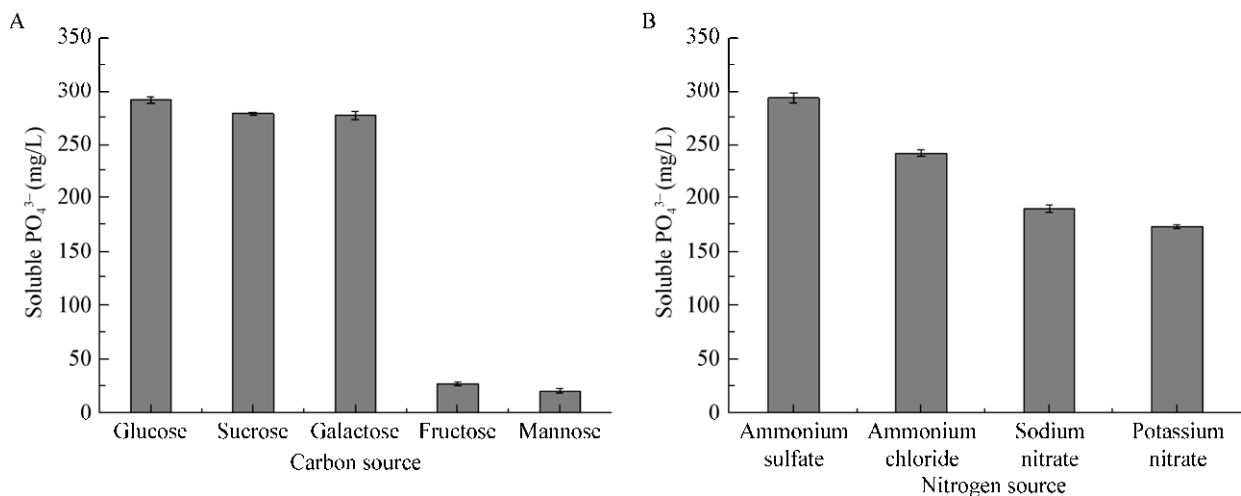


图7 不同碳源(A)、氮源(B)对 G7 的解磷量的影响
Figure 7 The effect of different culture carbon (A) and nitrogen (B) sources on G7 phosphate-solubilizing quantity

碳源为葡萄糖时 G7 菌体量最高，甘露糖为碳源时 G7 的菌体量最低。同时，氮源为硫酸铵时 G7 的菌体量最高，氮源为硝酸钾时 G7 的菌体量最低。结果说明葡萄糖为 G7 最佳解磷和生长的碳源，硫酸铵为 G7 最佳解磷和生长的氮源。

2.4 G7 解磷机理的初步研究

2.4.1 发酵液中的有机酸测定

由表 4 可知 G7 在发酵过程中产生多种有机酸，乳酸和乙酸的产量最大，甲酸和柠檬酸的产量次之，从发酵时间来看这 4 种酸的产量呈增长趋势，而其他几种酸产量比较低，尤其是富马酸产量最低；同时也能看出酒石酸、苹果酸和丁酸的产量在整个发酵过程中的变化比较平稳。丁二酸在第 3 天开始产生，随着时间的增加丁二酸的产量呈增长趋势。

2.4.2 发酵液磷酸酯酶活性的测定

由图 9 可知，在磷酸三钙培养基中 G7 的酸性磷酸酯酶酶活要高于碱性磷酸酯酶的酶活，在第 3 天时 2 种酶活达到最高，酸性磷酸酯酶活性达到 155.68 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ ，碱性磷酸酯酶活性达到 96.27 $\mu\text{mol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。前 3 天 2 种酶活在培养基中的活性都增长迅速，原因可能是在缺磷的环境下磷酸酯酶被胁迫产生；第 4 天之后 2 种酶活的活性持续下降，原因可能是由于发酵后期营养物质的消耗导致菌体数量下降，从而致使酸性和碱性磷酸酯酶的活性下降。

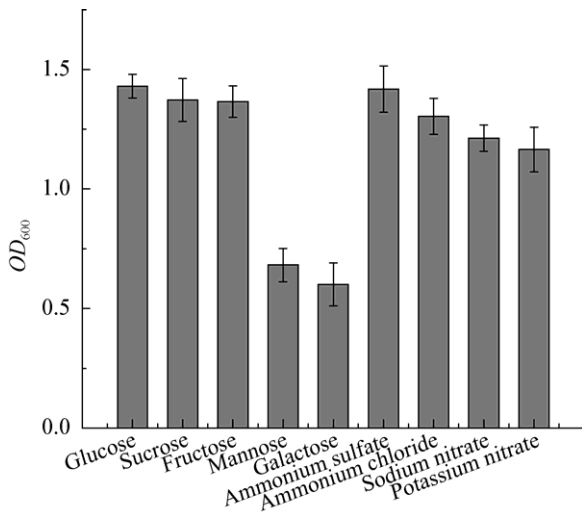


图8 不同碳、氮源对 G7 菌体量的影响

Figure 8 The effect of different culture carbon and nitrogen sources on G7 biomass

表4 G7 发酵液中有有机酸浓度测定结果

Table 4 Organic acids concentration in G7 fermentation broth (mg/L)

有机酸 Organic acids	Fermentation time (d)			
	1	3	5	7
酒石酸 Tartaric acid	51.78	68.53	68.24	69.65
甲酸 Formic acid	91.37	139.40	245.19	185.99
苹果酸 Malic acid	46.24	50.79	52.31	56.99
乳酸 Lactate	1 915.24	4 103.72	4 275.08	4 837.73
乙酸 Acetic acid	1 988.31	2 104.40	2 158.60	2 347.74
柠檬酸 Citric acid	81.89	140.76	159.57	186.37
丁二酸 Succinic acid	0	36.55	54.61	61.84
富马酸 Fumaric acid	1.06	1.11	1.15	1.30
丙酸 Propionic acid	33.74	29.47	32.44	31.16
丁酸 Butyric acid	63.54	63.56	69.42	64.75

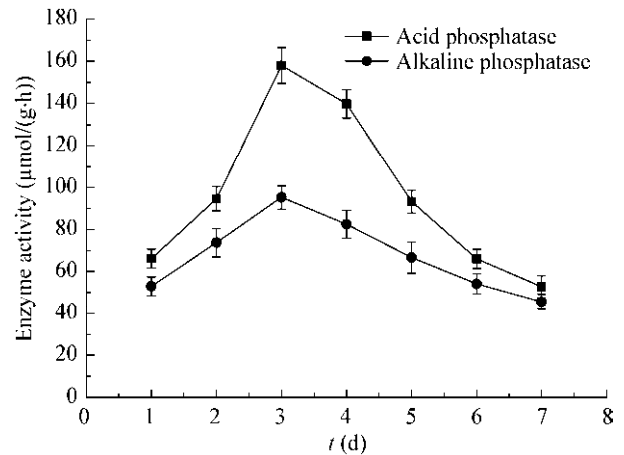


图9 G7 发酵液中磷酸酯酶酶活

Figure 9 Phosphatase activity in G7 fermentation broth

3 讨论与结论

当前国内外有许多关于植物根际解磷细菌的相关报道,许多学者从不同的植物根际筛选到了具有解磷能力的菌种,包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、无色杆菌属(*Achromobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、固氮螺旋菌属(*Azospirillum*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、金黄杆菌属(*Chryseobacterium*)、柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、草螺旋菌属(*Herbaspirillum*)、泛菌属(*Pantoea*)等^[19]。Antoun 等^[20]研究发现在植物根际土壤中约有 54% 的根际微生物具有解磷能力。Mehta 等^[21]从苹果树根际土壤和内生包裹分离到具有解磷能力的芽孢杆菌等。但是关于具有解磷能力的肠膜明串珠菌尚未见相关报道,本实验从采自赣南脐橙根际土壤中筛选到一株具有解磷能力的肠膜明串珠菌。通过 16S rRNA 基因序列分析和生理生化实验,鉴定 G7 属于肠膜明串珠菌亚菌,并命名为肠膜明串珠菌 G7。G7 的发现更新了解磷菌种的种类,丰富了解磷菌种的资源,为解磷微生物的研究提供了新的空间。

很多学者通过单因素、响应面或者正交实验^[22],

综合探究了他们所筛选菌种的解磷和生长条件, 深入研究了解磷微生物的生长和培养液 pH 的变化与菌种解磷能力的相关性^[15]。本实验通过单因素实验测定发酵液中 G7 的菌体量、解磷量和 pH 变化这三方面的数据, 不仅能够确定 G7 的最佳解磷条件和深入了解 G7 的解磷能力。在研究 G7 对不同磷源的分解时, 发现不同磷源发酵液的 pH 降低大致相同, 但是 G7 对不同磷源的分解能力却相差很大, 所以初步认为 G7 解磷能力与 pH 的降低相关性较小。对于 G7 解磷能力和解磷条件还需要更深入的研究。

目前的报道中溶磷菌种类繁多, 解磷机理复杂多样, 但是大多数学者认为微生物解磷能力主要取决于其产有机酸的能力。王同等^[23]通过研究从红壤中筛选到的解磷菌 B1, 了解到 B1 的解磷能力与其分泌的苹果酸和草酸有关。管国强等^[24]以磷酸钙作为难溶性磷源对伯克霍尔德氏菌 P0417 的解磷机制进行了研究, 分析发现不仅分泌有机酸是解磷能力的主要原因, 而且磷酸酯酶对 P0417 的解磷效果也有一定的影响。Narsian 等^[25]通过研究认为解磷微生物主要的解磷机制是通过产生大量的有机酸和磷酸酯酶。本实验通过测定发酵液中的小分子有机酸和磷酸酯酶酶活了解 G7 的解磷能力, G7 在发酵过程中产生大量有机酸, 但无论是酸性还是碱性磷酸酯酶的活性都不高, 可以初步认为 G7 的解磷能力主要是由于其产生的大量有机酸的作用。然而, 至于 G7 解磷能力到底是哪几种酸的作用, 需要进一步研究。目前关于微生物解磷机理的研究还需要结合现代分子生物技术进行更深入的探究。

REFERENCES

- [1] Baliah NT, Pandiarajan G, Kumar BM. Isolation, identification and characterization of phosphate solubilizing bacteria from different crop soils of Srivilliputtur Taluk, Virudhunagar District, Tamil Nadu[J]. Tropical Ecology, 2016, 57(3): 465-474
- [2] Zeng QW, Wu XQ, Wang JC, et al. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(4): 844-855
- [3] Wei YQ, Zhao Y, Shi MZ, et al. Effect of organic acids production and bacterial community on the possible mechanism of phosphorus solubilization during composting with enriched phosphate-solubilizing bacteria inoculation[J]. Bioresource Technology, 2017, 247: 190-199
- [4] Whitelaw MA, Harden TJ, Helyar KR. Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 1999, 31(5): 655-665
- [5] Zheng BX, Hao XL, Ding K, et al. Long-term nitrogen fertilization decreased the abundance of inorganic phosphate solubilizing bacteria in an alkaline soil[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 42284
- [6] Liu FP, Liu HQ, Zhou HL, et al. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils[J]. Biology and Fertility of Soils, 2014, 50(6): 927-937
- [7] Sahay R, Patra DD. Identification and performance of sodicity tolerant phosphate solubilizing bacterial isolates on *Ocimum basilicum* in sodic soil[J]. Ecological Engineering, 2014, 71: 639-643
- [8] Vassilev N, Medina A, Azcon R, et al. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake[J]. Plant and Soil, 2006, 287(1/2): 77-84
- [9] Ruangsanka S. Identification of phosphate-solubilizing bacteria from the bamboo rhizosphere[J]. Science Asia, 2014, 40(3): 204-211
- [10] Wu DC, Teng D, Xi D, et al. Rapid cloning, expression and purification of a novel high-activity alkaline phosphatase with detoxification of lipopolysaccharide[J]. Process Biochemistry, 2014, 49(3): 402-408
- [11] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th ed. Translated by Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 中国科学院微生物研究所, 译. 北京: 科学出版社, 1984
- [12] Ling DW, Dong XZ. Classification and Identification of Lactic Acid Bacteria and Experimental Methods[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999 (in Chinese)
凌代文, 东秀珠. 乳酸细菌分类鉴定及实验方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1999
- [13] Thabet OBD, Gtari M, Sghaier H. Microbial diversity in phosphate rock and phosphogypsum[J]. Waste and Biomass Valorization, 2017, 8(7): 2473-2483
- [14] Kang SM, Radhakrishnan R, You YH, et al. Phosphate solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 regulates endogenous plant carbohydrates and amino acids contents to promote mustard plant growth[J]. Indian Journal of Microbiology, 2014, 54(4): 427-433
- [15] Zhao XR, Lin QM, Li BG. Effect of C, N sources and C/N ratio on the solubilization of rock phosphate by some microorganisms[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2002, 8(2): 197-204 (in Chinese)

- 赵小蓉, 林启美, 李保国. C、N 源及 C/N 比对微生物溶磷的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(2): 197-204
- [16] Liu SL, Zhu SL, Qi XH, et al. Study on organic acid secreted from 4 strains phosphorus-solubilizing bacteria and calcium phosphate dissolving ability[J]. Xinjiang Agricultural Science, 2017, 54(6): 1114-1121 (in Chinese)
- 刘胜亮, 朱舒亮, 祁先慧, 等. 四株解磷菌分泌有机酸与溶解磷酸三钙能力的研究[J]. 新疆农业科学, 2017, 54(6): 1114-1121
- [17] Shi GY, Mo YM, Cen ZL, et al. Identification of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain BS06 and analysis on its phosphate solubilization ability[J]. Microbiology China, 2015, 42(7): 1271-1278 (in Chinese)
- 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
- [18] Lee DH, Choi SL, Rha E, et al. A novel psychrophilic alkaline phosphatase from the metagenome of tidal flat sediments[J]. BMC Biotechnology, 2015, 15: 1
- [19] Zhao XR, Lin QM. A review of phosphate-dissolving microorganisms[J]. Soils and Fertilizers, 2001(3): 7-11 (in Chinese)
- Ammonium chloride
- 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
- [20] Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, et al. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.)[J]. Plant and Soil, 1998, 204(1): 57-67
- [21] Mehta P, Walia A, Shirkot CK. Functional diversity of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacteria isolated from apple trees in the Trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India[J]. Biological Agriculture & Horticulture, 2015, 31(4): 265-288
- [22] Khoshayand F, Goodarzi S, Shahverdi AR, et al. Optimization of culture conditions for fermentation of soymilk using *Lactobacillus casei* by response surface methodology[J]. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 2011, 3(3/4): 159-167
- [23] Wang T, Kong LY, Jiao JG, et al. Screening of phosphate-solubilizing bacteria in red soil and their acting mechanisms[J]. Acta Pedologica Sinica, 2014, 51(2): 373-380 (in Chinese)
- 王同, 孔令雅, 焦加国, 等. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷机制[J]. 土壤学报, 2014, 51(2): 373-380
- [24] Guan GQ, Li Q, Ji RR, et al. Phosphate-dissolving mechanism of bacteria P0417[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2015, 43(10): 432-435 (in Chinese)
- 管国强, 李倩, 季蓉蓉, 等. 1 株溶磷细菌 P0417 的溶磷机制[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 432-435
- [25] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(4): 559-565