

研究报告

印度洋可培养解有机磷细菌的多样性及解磷特性

王琛^{1,2,3} 张学雷^{2,3} 崔龙波¹ 尚琨^{2,3} 曲凌云^{2,3*}

(1. 烟台大学 生命科学学院 山东 烟台 264005)

(2. 国家海洋局 第一海洋研究所 山东 青岛 266061)

(3. 国家海洋局 海洋生态环境科学与工程重点实验室 山东 青岛 266061)

摘要:【目的】筛选获得印度洋海水解有机磷细菌, 研究其解有机磷作用机理, 初步了解该地区可培养有机磷细菌的系统发育多样性。【方法】采用卵磷脂培养基从分离自印度洋的细菌中筛选解有机磷细菌, 根据 16S rRNA 基因序列确定获得的有机磷细菌的分类地位; 同时挑选解磷效果显著的 3 株细菌利用液体发酵进行产酶和解磷特性分析。【结果】自 916 株细菌中得到 99 株具有解有机磷活性的细菌, 分属于 16 个属。在以卵磷脂为其有机磷来源时, 菌株 India-BSP-1 (*Cobetia* sp.)、India-BSP-21 (*Pelagibaca* sp.)、India-BSP-23 (*Pelagibacterium* sp.) 的培养液中磷酸盐(DIP)浓度曲线为 N 型, 并且碱性磷酸酶的检测活性滞后于 DIP 的生成。【结论】印度洋海水中解有机磷细菌种类多样性丰富, 疑似有新种; 解有机磷细菌的解磷特性受 DIP 和碱性磷酸酶相互作用的影响。

关键词: 解有机磷细菌, 分子鉴定, 解磷特性, 碱性磷酸酶

Diversity and characteristics of culturable phosphate-solubilizing bacteria of Indian Ocean

WANG Chen^{1,2,3} ZHANG Xue-Lei^{2,3} CUI Long-Bo¹ SHANG Kun^{2,3}
QU Ling-Yun^{2,3*}

(1. School of Life Sciences, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China)

(2. First Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Qingdao, Shandong 266061, China)

(3. Key Laboratory of Science and Engineering for Marine Ecology and Environment, State Oceanic Administration, Qingdao, Shandong 266061, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to screen culturable phosphate-solubilizing bacteria from water samples of the Indian Ocean, and tackle their mechanism of regenerating phosphate from organics and their phylogenetic diversity in the region. [Methods] Phosphate-solubilizing bacteria were selected by inoculating bacteria isolated from the Indian Ocean waters onto solid lecithin medium, and the phosphate-solubilizing bacteria were identified according to their 16S rRNA genes. Three strains of high phosphate-solubilizing activities were studied for their alkaline phosphatase production and phosphate-solubilizing in fermentation liquid. [Results] A total of 99 phosphate-solubilizing strains

基金项目: 全球变化与海气相互作用专项基金项目(No. GASI-02-IND-ST-Sspr, GASI-03-01-03-03)

*通讯作者: ✉: qly@fio.org.cn

收稿日期: 2014-12-22; 接受日期: 2015-04-23; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-05-21

from 16 genera were selected from the 916 available bacteria strains. The dissolved inorganic phosphate (DIP) concentration presented N-type curves in cultures of all the three active phosphate-solubilizing stains India-BSP-1 (*Cobetia* sp.), India-BSP-21 (*Pelagibaca* sp.), India-BSP-23 (*Pelagibacterium* sp.), and the alkaline phosphatase was detected after DIP production. **[Conclusion]** Phosphate-solubilizing bacteria of the Indian Ocean waters presented rich species diversity and three candidate new species. The characteristics of bacterial regeneration of phosphate from organics were influenced by both DIP and alkaline phosphatase.

Keywords: Phosphate-solubilizing bacteria, Molecular identification, Characteristics of phosphate solubilization, Alkaline phosphatase

磷是海洋生态系统的重要营养盐之一,是海洋浮游植物生长和繁殖所必需的成分,也是海洋初级生产力和食物链的基础元素,它在全部生物代谢(尤其是能量转换)过程中起着重要作用^[1]。海洋中磷的存在形式有可溶性有机磷(Dissolved organic phosphorus, DOP)、悬浮态颗粒磷、可溶性活性磷等,其中可溶性活性磷主要是指可溶性无机磷(Dissolved inorganic phosphorus, DIP)。在大部分海洋区域的表层海水中,DOP的浓度超过DIP^[2]。倪建宇等^[3]在对南印度洋海区营养盐的分布特征研究表明,南印度洋表层水体中的磷主要以有机态形式存在,且表层水体中有机氮和磷是水体初级生产所需营养盐的重要来源。但DOP必需首先转化成DIP才能被细菌和浮游植物利用^[4]。

据Saánchez-Romañ等^[5]报道,微生物活动对DIP释放具有重要的影响。有机态磷的降解主要依赖于解有机磷细菌;解有机磷细菌能够把有机磷酸盐降解转化成DIP,从而增加水体中DIP的含量^[6]。细菌对有机颗粒物的分解代谢是水体营养盐再生的核心场所^[7]。水体中磷的循环与再生依赖于细菌等微生物对颗粒态、溶解态有机质的分解释放^[8]。有研究表明,海洋中的初级生产力每年所消耗的磷,99%是由再循环的过程提供的^[9]。微生物分泌的酶对DOP的酶解作用是DIP利用的主要机制^[10]。解有机磷细菌的作用原理一般认为主要是细菌分泌的胞外碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, APase)的酶解作用^[11]。

目前,解有机磷细菌的相关报道,大多集中于土壤解有机磷细菌的研究,海洋中关于解有机磷细

菌报道较少^[12]。本实验从分离自印度洋的细菌中筛选获得解有机磷细菌,利用16S rRNA基因序列对获得的解有机磷菌进行多样性初步分析,并对其解磷特性的分析,旨在为进一步研究海洋解有机磷菌提供参考,也将对研究海洋中磷的地球化学循环具有重要的理论和现实意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 样品: 实验菌种是从印度洋27个微生物站位培养出的细菌,菌种保藏于本实验室。

1.1.2 培养基: (1) 卵磷脂固体培养基(g/L)^[13]: 葡萄糖 10.00、(NH₄)₂SO₄ 0.50、MgSO₄·7H₂O 0.30、NaCl 30.00、KCl 0.30、FeSO₄·7H₂O 0.03、MnSO₄·7H₂O 0.03、CaCO₃ 5.00、卵磷脂 0.20、酵母提取物 0.40、琼脂 20.00、pH 7.0–7.5。除卵磷脂外,其余试剂加入培养基,0.07 MPa 灭菌 20 min; 卵磷脂用无菌水等体积稀释后,待培养基灭菌后冷却至 50 °C 左右加入,每 100 mL 培养基加入卵磷脂稀释液 3–4 mL。(2) 卵磷脂液体培养基: 除不加琼脂外,其余配方同卵磷脂固体培养基。(3) 2216E 培养基(g/L): 酵母提取物 5、胰蛋白胨 10、琼脂 20、陈海水,0.1 MPa 灭菌 20 min。

1.2 方 法

1.2.1 解有机磷细菌的平板筛选: 将待选菌株活化后挑取单菌落,分别接种于卵磷脂固体培养基上进行初筛,28 °C 倒置于恒温培养箱中培养 3–5 d,挑取菌落周围有透明水解圈的细菌,再次点种在卵磷脂固体培养基上,28 °C 倒置于恒温培养箱中培养

3–5 d 进行复筛。将复筛所获得的解磷现象稳定的菌株进行 16S rRNA 基因测序鉴定并冷冻干燥保存。

1.2.2 16S rRNA 基因的扩增与序列分析: (1) 16S rRNA 基因模板的制备: 用灭菌的牙签挑取 2–3 个单菌落于 20 μL RNA free 水中混匀。置于 PCR 仪, 99 $^{\circ}\text{C}$ 15 min。取上清液。(2) PCR 扩增所用引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系 (60 μL): 2 \times Taq mix 30 μL , 引物 27F (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 3 μL , 模板 3 μL , 无菌水补足至 60 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将 PCR 产物送至上海桑尼生物科技有限公司测序。(3) 将复筛获得的解有机磷细菌的 16S rRNA 基因扩增序列通过 EzBio Cloud 数据库 (<http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>) 进行比对。一般认为, 16S rRNA 基因序列相似性大于 98%, 可以认为是同一个种, 同源性小于 98% 可以认为是不同的种, 小于 95% 可以认为属于不同的属^[14]。分别计数不同属的菌株个数。用 DNASTar 软件比对相同菌属内的菌株来初步分析相同菌属内的不同菌种类。将获得的 16S rRNA 基因序列提交到 GenBank 进行序列号的注册。

1.2.3 解有机磷细菌的系统发育学分析: 将复筛所获得的解有机磷菌株的 16S rRNA 基因扩增的序列, 通过 MEGA 软件^[15] 采用邻接法 (Neighbor-Joining) 建立系统发育树, 通过自展分析 (Boot strapping) 进行系统发育树的评估, 自展数据集为 1 000 次。

1.2.4 解有机磷细菌的平板解磷活性的测定: 将筛选出的不同菌种的解有机磷细菌分别点接种于卵磷脂固体培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d, 肉眼观察, 进行透明圈直径和菌落直径之比的测量。

1.2.5 解有机磷细菌产胞外碱性磷酸酶的平板筛选: 将透明圈直径和菌落直径比大于 1.5 的菌株进行产胞外碱性磷酸酶分析。挑选出的菌株点种在卵磷脂培养基上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d。在 96 孔板中加入 0.1 mol/L 碳酸盐缓冲液 (含 4-氨基安替比林, pH

10.0) 50 μL , 用灭菌牙签取培养好的各菌种等量菌体与测样孔中缓冲液充分混匀 (空白对照孔不加菌体), 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min。再加入已预热的磷酸苯二钠溶液 (0.02 mol/L) 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 15 min。最后加入铁氰化钾溶液 150 μL , 显色并终止反应。每个菌株设两孔平行样。以红色深浅初筛碱性磷酸酶产生菌。

1.2.6 有机磷发酵液中磷酸盐 (DIP) 和碱性磷酸酶浓度的测定: 根据细菌在卵磷脂平板上解磷能力的大小和产酶大小筛选的结果, 筛选解磷能力强且产酶量高的菌株进行液体发酵。将待测菌株接种于 2216E 培养基上培养至菌体长出, 接种于 300 mL 卵磷脂液体培养基中, 不接种的培养基作为空白对照, 每株菌和空白设 3 个平行样, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振荡培养 15 d, 每隔 12 h 取样, 测定发酵液中 DIP 浓度, 胞外碱性磷酸酶含量及其 pH 值。磷浓度采用钼蓝比色法测定^[16]。

碱性磷酸酶活力单位: 37 $^{\circ}\text{C}$ 下每分钟产生 0.01 μmol 游离酚的酶量为一个酶活单位 (U)。

2 结果与分析

2.1 解有机磷细菌的筛选

针对 916 株目的菌株初筛获得解有机磷细菌 154 株。经复筛最终获得仍有解磷效果的 99 株菌, 占全部来源菌株数的 10.8%。解磷现象如图 1 所示。

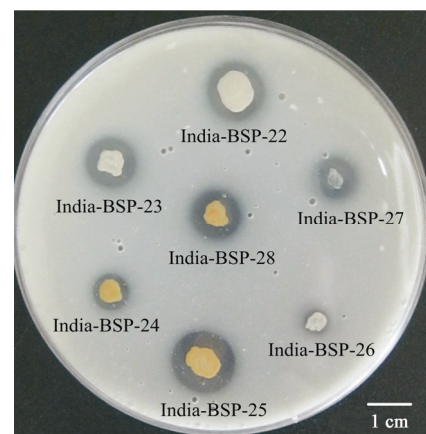


图 1 解有机磷细菌在有机磷固体培养基上产生的解磷圈
Figure 1 Phosphate-solubilizing zone on plate produced by organic phosphate-solubilizing bacterial strains

2.2 解有机磷细菌的 16S rRNA 基因序列分析

将所测菌株的 16S rRNA 基因序列进行 EzBio Cloud 序列比对和 DNASTar 序列比对分析, 根据序列同源性比对结果初步确定了所获得的解有机磷

细菌分属于 16 个属 28 种, 不同种解有机磷细菌代表菌株 EzBio Cloud 结果如表 1 所示。将所测菌株的 16S rRNA 基因序列进行 GenBank 注册, 注册号为 KP901109–KP901136 (表 1)。

表 1 不同种解有机磷细菌代表菌株的 EzBio Cloud 比对结果

代表菌株 Representative strains	最近物种 Closest match	菌株数 Numbers of strains	相似度 Similarity (%)	代表菌株 16S rRNA 基因的 GenBank 注册号 GenBank of representative strains
India-BSP-1	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 ^T	1	100	KP901109
India-BSP-2	<i>Microbacterium aquimaris</i> JS54-2 ^T	1	99.0	KP901110
India-BSP-3	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> ATCC 29970 ^T	1	100	KP901111
India-BSP-4	<i>Staphylococcus equorum</i> subsp. <i>linens</i> RP29 ^T	1	100	KP901112
India-BSP-5	<i>Psychrobacter nivimaris</i> 88/2-7 ^T	1	99.3	KP901113
India-BSP-6	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962 ^T	1	99.3	KP901114
India-BSP-7	<i>Acinetobacter haemolyticus</i> DSM 6962 ^T	2	96.9	KP901115
India-BSP-8	<i>Salinicola salarius</i> M27 ^T	1	99.6	KP901116
India-BSP-9	<i>Hafnia paralvei</i> ATCC 29927 ^T	1	97.8	KP901117
India-BSP-10	<i>Zunongwangia profunda</i> SMA-87 ^T	7	100	KP901118
India-BSP-11	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	15	99.7	KP901119
India-BSP-15	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T	2	98.3	KP901120
India-BSP-18	<i>Halomonas alkaliphila</i> 18bAG ^T	2	99.5	KP901121
India-BSP-19	<i>Zunongwangia profunda</i> SMA-87 ^T	1	97.1	KP901122
India-BSP-20	<i>Sulfitobacter dubius</i> KMM 3554 ^T	1	96.8	KP901123
India-BSP-21	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601 ^T	44	99.7	KP901124
India-BSP-23	<i>Pelagibacterium halotolerans</i> B2 ^T	2	99.8	KP901125
India-BSP-24	<i>Aurantimonas litoralis</i> HTCC 2156 ^T	1	100	KP901126
India-BSP-25	<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i> ATCC 21588 ^T	1	99.1	KP901127
India-BSP-26	<i>Paracoccus oceanense</i> JLT1679 ^T	1	100	KP901128
India-BSP-27	<i>Paracoccus caeni</i> MJ17 ^T	1	98.1	KP901129
India-BSP-28	<i>Paracoccus marcusii</i> DSM 11574 ^T	1	100	KP901130
India-BSP-30	<i>Kocuria palustris</i> DSM 11925 ^T	1	100	KP901131
India-BSP-31	<i>Halomonas hydrothermalis</i> Slthf2 ^T	4	100	KP901132
IO-68-2	<i>Halomonas denitrificans</i> M29 ^T	2	98.3	KP901134
IO-84	<i>Halomonas meridiana</i> DSM 5425 ^T	1	100	KP901136
IO-90	<i>Zunongwangia profunda</i> SMA-87 ^T	1	99.5	KP901135
IO-122	<i>Maribacter dokdonensis</i> DSW-8 ^T	1	99.5	KP901133

2.3 解有机磷细菌的种群分布

图 2 显示各属解有机磷菌株所占的比例: 菌株数量最多的属是 *Pelagibaca* (远洋橄榄球形菌属), 共有 44 株, 占 44.45%; 其次是 *Halomonas* (盐单胞菌属), 共有 26 株, 占 26.26%; *Zunongwangia* (王祖农式菌属), 共有 9 株; *Paracoccus* (副球菌属)、*Acinetobacter* (不动杆菌属)、*Pelagibacterium*、*Staphylococcus* (葡萄球菌属)、*Aurantimonas* (褐杆菌属) 分别有 4、3、2、2、2 株; 剩余菌属各有 1 株。图 3 显示各属解有机磷细菌种类所占的比例: 种类数最多的属是 *Halomonas* (盐单胞菌属), 共有 6 种 *Halomonas*, 占 21.43%; 其次是 *Paracoccus* (副球菌属), 共有 4 种 *Paracoccus*, 占 14.30%; *Zunongwangia* (王祖农式菌属) 有 3 种, *Acinetobacter* *Staphylococcus* 各有 2 种; 其余菌属各有 1 种。

2.4 解有机磷细菌的系统发育分析

通过扩增获得的 16S rRNA 基因序列在 EzBio Cloud 进行序列比对结果, 结果表明编号为 India-BSP-7 (*Acinetobacter* sp.)、India-BSP-19 (*Zunongwangia* sp.)、India-BSP-9 (*Hafnia* sp.) 的菌株

16S rRNA 基因序列在 EzBio Cloud 的同源性比对结果分别是 96.9%、97.1%、97.8%, 疑似为新种。将 28 种解有机磷细菌构建系统发育树(图 4)。

2.5 解有机磷细菌平板解磷活性的测定

解有机磷细菌在有机磷固体培养基上形成的透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值(D/d)是解有机磷细菌相对解磷能力的指标, 可初步判别菌株降解有机磷的效果^[17]。解磷菌在平板上的解磷现象见图 1, 测量其中有明显透明圈的菌株在有机磷固体培养基上形成的透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值结果列于表 2。由结果可知, 有 21 株解磷菌形成的透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值均大于 1.5, 解磷效果优于其他菌株, 可作为进一步研究的对象。

2.6 解有机磷细菌胞外碱性磷酸酶初筛

根据有机磷平板和 16S rRNA 基因的鉴定结果, 从复筛得到的菌株中挑选出透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值均大于 1.5 的 21 株菌进行胞外碱性磷酸酶的初筛, 同时挑选透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值均小于 1.5 的 2 株菌作为对照,

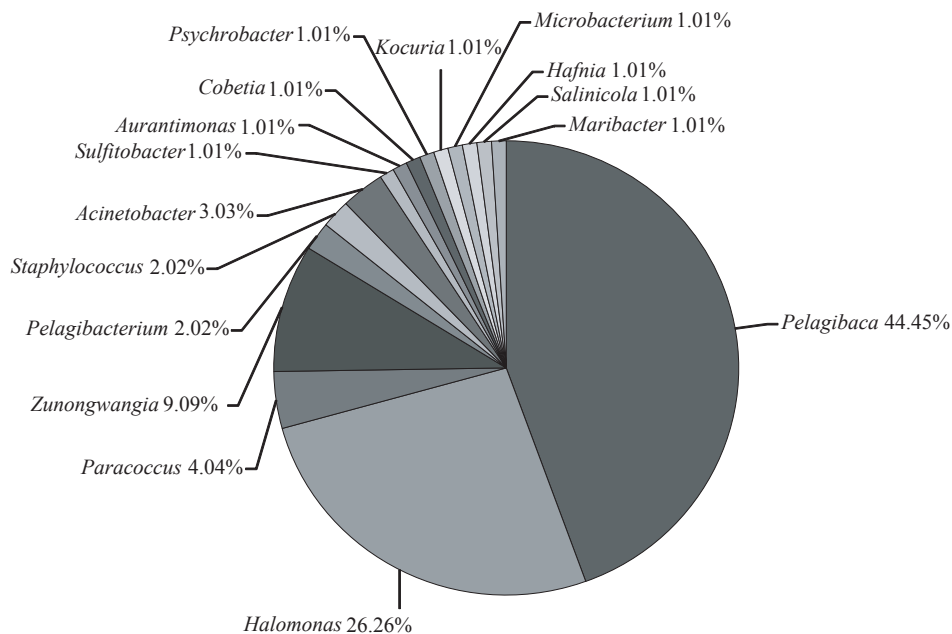


图 2 各属解有机磷细菌株数量比例图

Figure 2 Proportions of the strains from each genus of phosphate-solubilizing bacteria

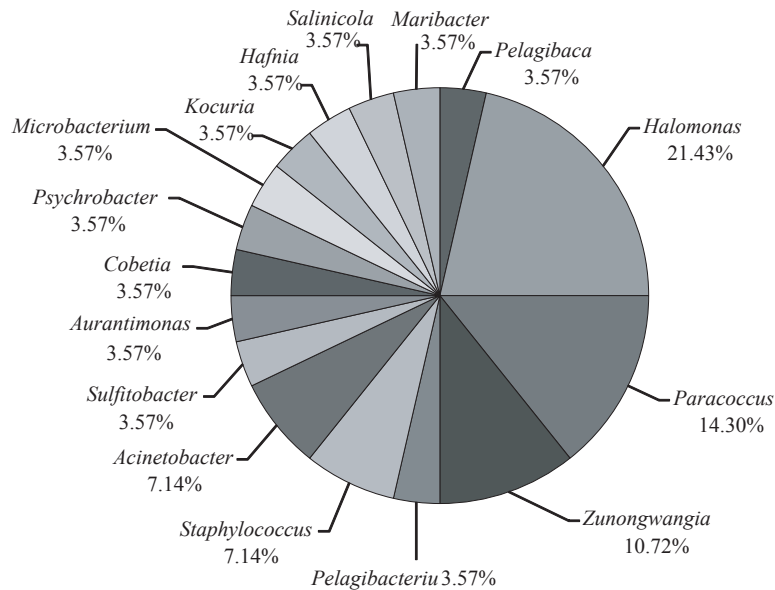


图3 各属解有机磷细菌种类数量比例图

Figure 3 Proportions of the species from each genus of phosphate-solubilizing bacteria

结果见图5。其中, India-BSP-2 (*Microbacterium* sp.)、India-BSP-5 (*Psychrobacter* sp.)、India-BSP-6 (*Acinetobacter* sp.)、India-BSP-7 (*Acinetobacter* sp.)、India-BSP-8 (*Salinicola* sp.)、India-BSP-30 (*Kocuria* sp.)没有胞外碱性磷酸酶的产生。其余菌株都有胞外碱性磷酸酶的产生,但酶活性不同。

2.7 3株菌的有机磷发酵液pH和碱性磷酸酶变化及其解有机磷能力

根据测量解有机磷细菌在有机磷固体培养基上形成的透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值(D/d)大小和胞外碱性磷酸酶活性大小,挑选 India-BSP-1 (*Cobetia* sp.)、India-BSP-21 (*Pelagibaca* sp.)、India-BSP-23 (*Pelagibacterium* sp.) 3株透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)的比值(D/d)相对较大、胞外碱性磷酸酶活性相对较高的菌株进行有机磷发酵液pH、碱性磷酸酶变化和其有机解磷能力的测定。

2.7.1 解有机磷细菌发酵液中pH变化: India-BSP-1、India-BSP-21、India-BSP-23有机磷发酵液pH变化如图6所示。由图6可知, India-BSP-1发酵液中的pH在72h内由 7.53 ± 0.17 降到

6.37 ± 0.08 ,并稳定在 $(6.32 \pm 0.03) - (6.48 \pm 0.02)$ 之间;第6天起,pH开始上升,到11d达最大值 8.00 ± 0.04 ;到第300h,pH开始下降到 7.33 ± 0.11 ,略低于空白值; India-BSP-21发酵液中的pH到第4天达到最低值,由 7.53 ± 0.17 降低到 6.17 ± 0.06 ,然后开始升高;到228h后,pH升高到 7.70 ± 0.06 ;此后,pH下降并最终稳定在 7.50 ± 0.10 左右; India-BSP-23的pH在接种后的第2天达到最低值 6.45 ± 0.06 ,到第10天时达到最大值 7.98 ± 0.03 ,然后pH开始下降;第12天,pH下降并稳定在 $(7.14 \pm 0.06) - (7.21 \pm 0.03)$ 之间,比对照略低。

2.7.2 解有机磷细菌发酵液中DIP含量变化: India-BSP-1的DIP浓度变化如图7所示,在培养第36h、7天和12天时,DIP浓度均达到一次高峰,其峰值分别为 4.06 ± 0.33 、 9.28 ± 0.36 和 $8.46 \pm 0.34 \mu\text{mol/L}$,此后,DIP浓度降低并稳定在 $2.05 \pm 0.07 \mu\text{mol/L}$ 。 India-BSP-21的DIP浓度变化如图8所示,在培养第24h、36h和12天时,DIP浓度均出现一次高峰,其峰值分别为 2.55 ± 0.21 、 3.20 ± 0.13 和 $7.07 \pm 0.12 \mu\text{mol/L}$ 。第14天时浓度下降并稳定在 $(1.86 \pm 0.04) - (2.16 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$ 之间。

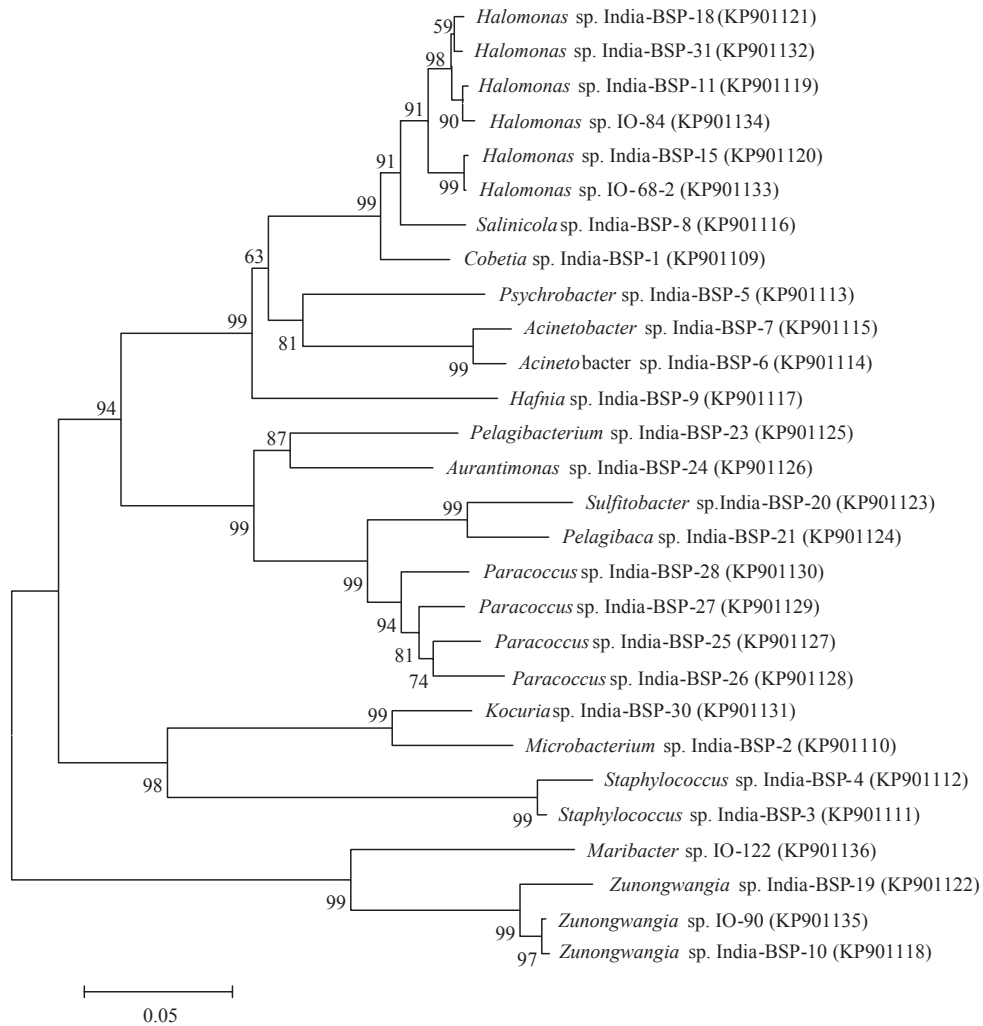


图 4 根据 16S rRNA 基因序列构建的 28 株解有机磷细菌的系统发育树

Figure 4 NJ phylogenetic tree of 28 organic phosphate-solubilizing bacterial strains based on 16S rRNA gene sequences

注: 括号内为 GenBank 登录号; 分支上的数字为自展值百分比; 线段 0.05 为核苷酸替换率。

Note: Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank; The number at each branch point is the percentage supported by bootstrap; Bar: 0.05 substitutions per nucleotide position.

表 2 解有机磷细菌透明圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)

Table 2 Ratio (D/d) of dissolving phosphate zone diameter (D) to culture community diameter the (d) of the organic phosphorus-solubilizing bacterial strains

菌株编号 Strain No.	D/d	菌株编号 Strain No.	D/d	菌株编号 Strain No.	D/d	菌株编号 Strain No.	D/d
India-BSP-1	1.882	India-BSP-8	2.000	India-BSP-20	2.000	India-BSP-28	2.017
India-BSP-2	1.601	India-BSP-9	1.667	India-BSP-21	2.125	India-BSP-30	1.295
India-BSP-3	2.000	India-BSP-10	1.789	India-BSP-23	2.143	India-BSP-31	1.165
India-BSP-4	2.363	India-BSP-11	1.766	India-BSP-24	1.601	IO-68-2	1.250
India-BSP-5	2.285	India-BSP-15	1.594	India-BSP-25	2.332	IO-84	1.197
India-BSP-6	1.875	India-BSP-18	1.765	India-BSP-26	1.534	IO-90	1.312
India-BSP-7	1.008	India-BSP-19	1.513	India-BSP-27	2.120	IO-122	1.073

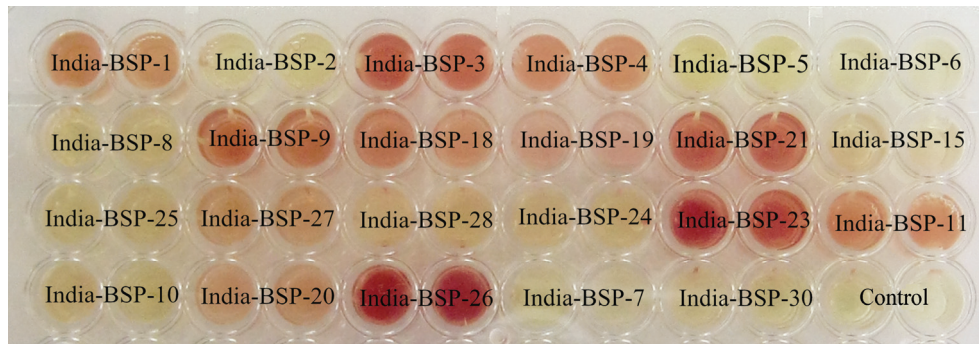


图5 解有机磷细菌胞外碱性磷酸酶的平板筛选

Figure 5 The tablet screening of organic phosphate-solubilizing bacterial strains' extracellular alkaline phosphatase

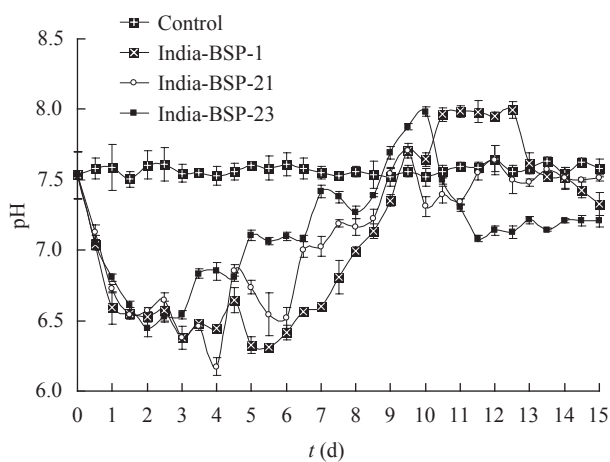


图6 India-BSP-1、India-BSP-21和India-BSP-23的有机磷发酵液中pH的变化

Figure 6 pH variation of fermentation liquid of strain India-BSP-1, India-BSP-21 and India-BSP-23

India-BSP-23 的 DIP 浓度变化如图 9 所示, 在接种后的前 6 天, DIP 浓度在 (1.01 ± 0.30) – (2.15 ± 0.03) $\mu\text{mol/L}$ 之间波动, 在第 144 h 浓度急剧上升, 此后, 在 156 h、8 d 和 12 d 时, DIP 浓度均出现一次 DIP 高峰, 其峰值分别为 5.30 ± 0.06 、 9.45 ± 0.14 和 6.20 ± 0.19 $\mu\text{mol/L}$ 。此后, 浓度缓慢下降到并稳定在 (1.65 ± 0.05) – (1.86 ± 0.11) $\mu\text{mol/L}$ 之间。

2.7.3 解有机磷细菌发酵液中碱性磷酸酶浓度变化: India-BSP-1 的 APase 浓度变化见图 7, 在发酵的前 5 天内, APase 浓度较低; 之后, APase 浓度迅速上升, 在 132 h 和 252 h, APase 浓度均出现一次高峰, 其峰值分别为 27.5 ± 0.51 U/L 和 3.0 ± 0.37 U/L。发酵末期, APase 浓度稳定在

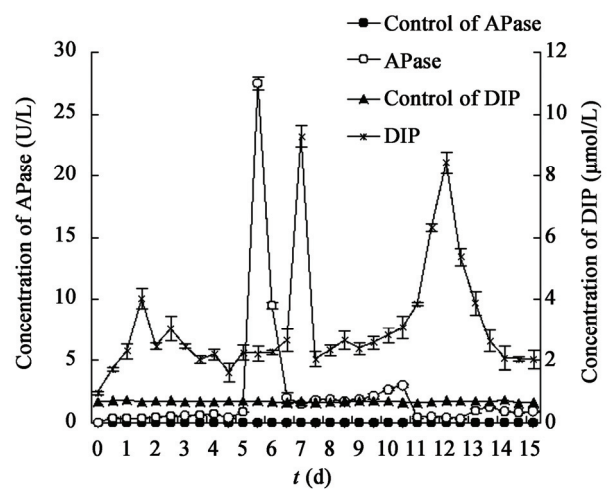


图7 India-BSP-1 发酵液中 APase 和 DIP 浓度变化

Figure 7 Concentration changes of APase and DIP in fermentation liquid of strain India-BSP-1

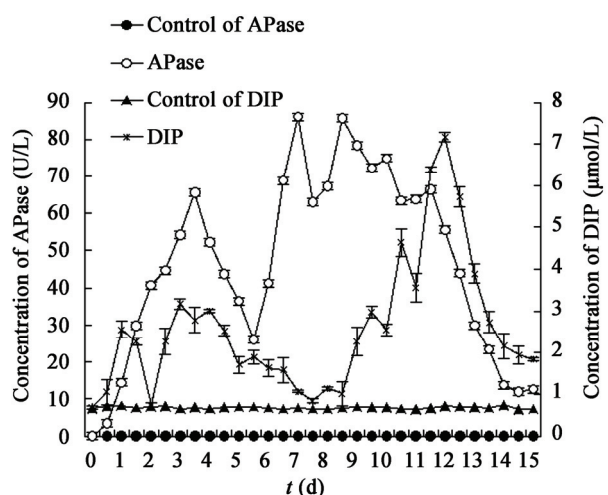


图8 India-BSP-21 发酵液中 APase 和 DIP 浓度变化

Figure 8 Concentration changes of APase and DIP in fermentation liquid of strain India-BSP-21

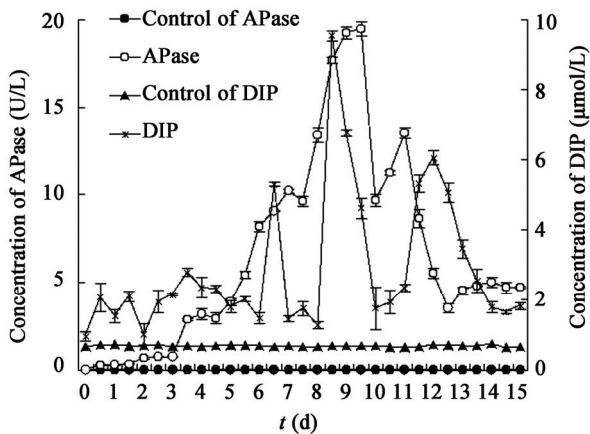


图9 India-BSP-23 发酵液中 APase 和 DIP 浓度变化
Figure 9 Concentration changes of APase and DIP in fermentation liquid of strain India-BSP-23

1.0±0.16 U/L 左右。India-BSP-21 的 APase 浓度变化见图 8, 在发酵培养的 15 d 内, APase 浓度出现 4 次高峰, 分别出现在第 84、148、196 和 240 h, 其峰值分别为 65.6±0.48、86.1±0.37、85.7±0.29 和 74.9±0.08 U/L。发酵末期, APase 浓度稳定在 12.3±0.03 U/L 左右。India-BSP-23 的 APase 浓度变化见图 9, 发酵的前 3 天, APase 浓度较低; 此后, APase 浓度分别在第 228 h 和 264 h 出现高峰, 其峰值分别为 19.5±0.33 U/L 和 13.5±0.28 U/L; 发酵末期, APase 浓度稳定在 4.7±0.10 U/L 左右。

3 讨论

通过平皿筛选从实验室保存的分离自印度洋水样的 916 株细菌中, 初筛得到 154 株, 复筛最终得到 99 株解有机磷细菌。对于在有机磷平板上没有解磷圈的细菌并不一定没有解磷效果, 可能是现象不明显^[18], 此方法只能初步筛选出解有机磷现象较明显的菌株, 对于平板筛选出的解磷菌应进行进一步的检测。在复筛过程中, 有 55 株菌丢失解磷现象。李剑锋等^[19]曾报道解磷细菌的解磷能力会在进一步纯化过程中丢失。林启美等^[20]的研究中也有相应的报道。通过对最终获得的 99 株解有机磷细菌进行分子鉴定和系统发育分析, 结果表明: 菌属数量最多的是远洋橄榄球形菌属, 其次是盐单胞菌

属。DNAStar 软件进行序列比对的 28 种不同种的解有机磷细菌中, 种数类别最多的菌属是盐单胞菌属, 其次是副球菌属。这说明, 在印度洋水域中的解有机磷细菌存在较为丰富的种群多样性, 主要优势菌株是远洋橄榄球形菌和盐单胞菌属, 对印度洋水域中有机磷的循环起重要作用。

目前, 实验室对于解有机磷细菌的筛选, 主要用卵磷脂作为有机磷的来源, 有机磷固体培养基中的卵磷脂能够被解有机磷细菌分泌的磷酸酶分解为胆碱、甘油、磷酸、脂肪酸, 胆碱被进一步分解为胺、二氧化碳、有机酸、醇, 最终使得透明圈形成^[21]。解有机磷细菌产生的透明圈直径(D)与菌落生长直径(d)比值的大小, 是初步比较和筛选, 只是对解磷菌进行了定性测定, 不能准确地表示细菌解磷能力的大小。对于菌株解磷量的精确测定, 还要利用化学分析方法进行定量分析^[22]。但是, 发酵液中 DIP 浓度的高低并不能作为准确判断解磷能力大小的标准, 根据赵小蓉等^[23]用液体培养法测量 DIP 浓度发现, 其解磷能力应该考虑细菌生长繁殖过程中是否利用其分解的磷元素。India-BSP-1、India-BSP-21、India-BSP-23 在有机解磷固体培养基上的解磷圈都比较明显, 并且 3 株菌的发酵液中 DIP 浓度都比较高, 且显著高于对照组。碱性磷酸酶的平板筛选结果显示, 对于 India-BSP-2、India-BSP-5、India-BSP-6、India-BSP-8 四株没有胞外碱性磷酸酶活性但有解磷现象的菌株, 可能是由于其他磷酸酶的作用, 有待于进一步研究。

培养基中 pH 值的下降与解磷菌分泌有机酸或者卵磷脂的降解产物有关, 或 H^+ 的其他来源, 如 NH_4^+/H^+ 交换机制和呼吸作用^[23], 但培养介质 pH 值的下降, 并不是解磷的必要条件^[6]。如图 6 所示, 培养基中 pH 值先下降后上升, 可能是由于细胞进入指数期, 生物量不断增加, 呼吸作用和代谢旺盛, 产生有机酸和 APase 较多, APase 彻底水解卵磷脂产生的有机酸也越多, pH 下降。到菌株指数生长后期, 细胞呼吸下降, 代谢减弱, 开始出现细胞裂

解, APase 水解卵磷脂产生胆碱, pH 上升。

解有机磷细菌的作用原理一般被认为主要是细菌分泌的胞外碱性磷酸酶的酶解作用。在利用卵磷脂作为有机磷来源的液体培养基中, DIP 磷浓度曲线为 N 型, 主要是因为 DIP 和磷酸酶的相互作用, 这与 Rossolinia 等^[24]的研究结果相似, 并且实验数据得出 DIP 浓度与 APase 浓度和 APA 的高峰存在滞后性, 且 APase 浓度和 APA 明显反比于 DIP 浓度。APase 是非特异性的磷酸单酯酶^[25], 是一组可诱导的酶, 并且酶的合成和活性明显受控于周围环境中 DIP 的浓度^[1,26], 且 APA 与解有机磷细菌生物量正相关^[27]。DIP 浓度随着 APase 浓度增加而增加, APase 浓度先达到最大值后 DIP 浓度再达到最大值。在此过程中, 细菌指数期生长消耗 DIP 用来增加生物量, DIP 浓度有所降低, 但当再次达到 DIP 浓度高峰时, 比前一个 DIP 浓度峰值大。而在细菌指数生长末期, 磷饥饿状态开始出现, 对于 APA 的抑制也随之发生逆转, 其生态学含义为在缺磷条件下解有机磷细菌将产生胞外碱性磷酸酶, 分解有机磷, 进而满足自身生长的需要^[28]。India-BSP-1 和 India-BSP-23 发酵液中的 APase 合成存在延迟现象。APase 合成的延迟现象可能与磷浓度有关, 可能是细菌磷浓度控制的阈值位点的磷的转运和积累^[29]。由图 7-9 可知, India-BSP-1、India-BSP-21 和 India-BSP-23 产生的 APase 峰值不同, 说明不同细菌有不同的 APase 峰值。当环境中 DIP 浓度过高时, 碱性磷酸酶的活性(Alkaline phosphatase activity, APA)被抑制, 而在细菌指数生长末期, 磷饥饿状态开始出现, 对于 APA 的抑制也随之发生逆转, 这种规律可被一般性地描述为“抑制-解抑制”^[30]或“诱导-抑制”机制^[31]。在湖泊、河流、水库、池塘和海洋中均有体现^[32]。由图 7-9 可知, India-BSP-1、India-BSP-21、India-BSP-23 在发酵过程中 DIP 均出现了先上升再下降, 而后再上升的趋势。由图 7 可

知, India-BSP-1 发酵后期 DIP 浓度的上升, 可能是部分细胞裂解, 之前被细胞储存的磷酸盐释放, 导致 DIP 浓度后期的升高, 或者是部分细胞裂解释放的一些可以水解卵磷脂的磷酸酶致使 DIP 浓度增加, 如 3'-核苷酸酶和 5'-核苷酸酶等, 这类酶不受磷胁迫^[17]。3 株菌所对应的 DIP 浓度和 APase 浓度均不同, 因此其解磷能力各异。关于碱性磷酸酶分子生物学基础的研究结果表明在海洋细菌不同类群中, 仅有有限数量的海洋细菌的碱性磷酸酶与作为经典研究对象的大肠杆菌的碱性磷酸酶相类似, 而不同特征的酶则广泛分布于多样化的细菌谱系。

研究表明, 印度洋水体中解有机磷细菌存在丰富的多样性和新的分类单元, 丰富了海洋解有机磷细菌的种类。通过对解有机磷细菌的解磷特性研究, 有助于初步了解解有机磷细菌的作用机理, 为海洋解有机磷细菌的研究奠定基础。关于印度洋解有机磷细菌解磷机制的分子研究将有待于下一步研究。

参 考 文 献

- [1] Qian YC, Shi JY, Chen YX, et al. Characterization of phosphate solubilizing bacteria in sediments from a shallow eutrophic lake and a wetland: isolation, molecular identification and phosphorus release ability determination[J]. *Molecules*, 2010, 15(11): 8518-8533
- [2] Kathleen CR, Sonya TD. Temporal and spatial variability of dissolved organic and inorganic phosphorus, and metrics of phosphorus bioavailability in an upwelling-dominated coastal system[J]. *Journal of Geophysical Research. Part C: Oceans*, 2005, 110(c10): C10S13-1-C10S13-22
- [3] Ni JY, Wang FG, Yao XY, et al. Nutrients distribution in the South India Ocean[J]. *Geoscience*, 2011, 25(2): 322-331 (in Chinese)
倪建宇, 王方国, 姚旭莹, 等. 南印度洋海区营养盐的分布特征[J]. *现代地质*, 2011, 25(2): 322-331
- [4] Ammerman JW, Azam F. Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration[J]. *Science*, 1985, 227(4692), 1338-1340
- [5] Sánchez-Román M, Rivadeneyra MA, Vasconcelos C, et al. Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(2): 273-284
- [6] Søndergaard M, Jensen JP, Jeppesen E. Role of sediment and internal of phosphorus in shallow lakes[J]. *Hydrobiologia*, 2003, 506/509: 135-145
- [7] David CS, Meinhard S, Alice LA, et al. Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution[J]. *Nature*, 1992, 359(6391): 139-142
- [8] Meinhard S, Hans-Peter G, Bernd S, et al. Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems[J]. *Aquatic Microbial*

- Ecology, 2002, 28(2): 175-211
- [9] Falkowski PG. Primary Production in the Sea[M]. New York: Plenum Press, 1980: 443-460
- [10] Ye GP, Liang JF. Research progress of phosphate-solubilizing bacteria's application and mechanism[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2007, 13(9): 53-54 (in Chinese)
叶国平, 梁锦锋. 解磷细菌(P₃B)解磷机理及应用研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(9): 53-54
- [11] Arnaud G, Chrystel L, Goularna G, et al. The preparation of new phosphorus-centered functional groups for modified oligonucleotides and other natural phosphates[J]. Molecules, 2005, 10(9): 1048-1073
- [12] Wang C, Tian XX, Qu LY. The phosphate-dissolving characteristics of organic phosphorus bacterium isolated from Jiulong River[J]. Marine Environmental Science, 2013, 32(5): 736-740 (in Chinese)
王琛, 田欣欣, 曲凌云. 九龙江口解有机磷细菌的解磷特性[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(5): 736-740
- [13] Niewolak S. Occurrence of microorganisms in fertilized lakes. II. Lecithin mineralizing Microorganisms[J]. Polskie Archiwum Hydrobiologii, 1980, 27: 53-71
- [14] Yarza P, Richter M, Peplies J, et al. The-All Species Living Tree Project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 30(4): 241-252
- [15] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599
- [16] Heekyung C, Myoungsu P, Munusamy M, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of crop plants of Korea[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2005, 37(10): 1970-1974
- [17] Hoppe HG. Phosphatase activity in the sea[J]. Hydrobiologia, 2003, 493: 187-200
- [18] Sangeeta M, Chandra SN. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria[J]. Current Microbiology, 2001, 43(1): 51-56
- [19] Li JF, Shi SL, Zhang SQ. Growth and phosphate-dissolving ability of strain SL01 under different storage temperatures and calcium phosphate levels[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2010, 18(1): 94-97 (in Chinese)
李剑锋, 师尚礼, 张淑卿. 不同 Ca₃(PO₄)₂含量及菌种保存温度下 SL01菌株的解磷及生长能力[J]. 中国生态农业学报, 2010, 18(1): 94-97
- [20] Lin QM, Zhao XR, Sun YX, et al. Community characters of soil phosphobacteria in four ecosystems[J]. Soil and Environmental Sciences, 2000, 9(1): 34-37 (in Chinese)
林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 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
- [21] Li WH, Shi JY. Isolation, purification, and phosphate-solubilizing capability of phosphorous bacteria in West Lake sediment[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(11): 2112-2116 (in Chinese)
李文红, 施积炎. 西湖沉积物中解磷菌的分离纯化及其解磷能力[J]. 应用生态学报, 2006, 17(11): 2112-2116
- [22] Wang YJ. Study on isolation purification and identification of phosphate-solubilizing bacteria and its biological characteristic[J]. Journal of Anhui Agriculture Science, 2008, 36(32): 13932-13933 (in Chinese)
王英健. 解磷细菌的分离纯化鉴定与生物学特性研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(32): 13932-13933
- [23] Zhao XR, Lin QM. The methods for quantifying capacity of bacteria in dissolving P compounds[J]. Microbiology China, 2001, 28(1): 1-4 (in Chinese)
赵小蓉, 林启美. 细菌解磷能力测定方法的研究[J]. 微生物学报, 2001, 28(1): 1-4
- [24] Rossolima GM, Schippab S, Riccio ML, et al. Bacterial nonspecific acid phosphatases: physiology, evolution, and use as tools in microbial biotechnology[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1998, 54(8): 833-850
- [25] Chung TDY, Sergienko E, Millán JL. Assay format as a critical success factor for identification of novel inhibitor chemotypes of tissue-nonspecific alkaline phosphatase from high-throughput screening[J]. Molecules, 2010, 15(5): 3010-3037
- [26] Sebastián M, Aristegui J, Montero MF, et al. Alkaline phosphatase activity and its relationship to inorganic phosphorus in the transition zone of the North-western African upwelling system[J]. Progress in Oceanography, 2004, 62(2/4): 131-150
- [27] Chappell KR, Goulder R. Enzymes as river pollutants and the response of native epilithic extracellular-enzyme activity[J]. Environmental Pollution, 1994, 86(2): 161-169
- [28] Marta S, James WA. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA[J]. The ISME Journal, 2009, 3(5): 563-572
- [29] Lisa MS, Sunendra RJ, Todd MK, et al. Microbial activities and phosphorus cycling: an application of oxygen isotope ratios in phosphate[J]. Geochimica et Cosmochimica Acta, 2014, 138: 101-116
- [30] Oh WS, Im YS, Yeon KY, et al. Phosphate and carbon source regulation of alkaline phosphatase and phospholipase in *Vibrio vulnificus*[J]. Journal of Microbiology, 2007, 45(4): 311-317
- [31] Cao XY, Song CL, Zhou YY. Limitations of using extracellular alkaline phosphatase activities as a general indicator for describing P deficiency of phytoplankton in Chinese shallow lakes[J]. Journal of Applied Phycology, 2010, 22(1): 33-41
- [32] David N, Sonya D, Francisco C, et al. Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco Bay[J]. Limnology and Oceanography, 2006, 51(2): 874-883