

研究报告

## 解淀粉芽孢杆菌 YP6 中碱性磷酸酯酶 AP3 的酶学性质及其溶磷作用

江威 吴秋兰 窦欣 管政兵 蔡宇杰 廖祥儒\*

(江南大学 生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【背景】微生物溶磷机制多种多样, 利用其解磷能力可有效促进植物生长。【目的】探究溶磷菌解淀粉芽孢杆菌 YP6 的溶磷机制, 提高磷资源的利用率。【方法】在大肠杆菌 BL21(DE3)中克隆并表达 YP6 中磷酸酯酶 AP3 基因, 研究 AP3 的酶学性质并验证 AP3 的溶磷作用。【结果】AP3 为碱性磷酸酯酶, 最适反应 pH 为 10.3, 最适反应温度为 40 °C, AP3 对 pNPP 亲和性较高,  $V_m$  为 4 033.4  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $K_m$  为 12.2 mmol/L。用纯酶 AP3 处理 24 h 后, 磷矿粉中的有效磷显著增加。接种菌株 YP6 发酵 7 d 后, 也使土样中有效磷明显增长。【结论】揭示了碱性磷酸酯酶 AP3 的溶磷能力, 丰富了溶磷微生物库及对微生物溶磷机制的认识。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌, 解磷酶, 碱性磷酸酯酶

## Characterization of a phosphorus-solubilizing alkaline phosphatase AP3 cloned from *Bacillus amyloliquefaciens* YP6

JIANG Wei WU Qiu-Lan DOU Xin 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] The mechanisms of solubilizing-phosphorus by organisms are diverse, which significantly stimulates plant growths. [Objective] To characterize a phosphorus-solubilizing alkaline phosphatase from *Bacillus amyloliquefaciens* YP6. [Methods] An alkaline phosphatase, AP3, of YP6 was cloned, expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3), characterized and its phosphorus-solubilizing effect tested. [Results] AP3 was an alkaline phosphatase, with optimal pH at 10.3 and optimal temperature at 40 °C.  $V_m$  was 4 033.4  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$  and  $K_m$  was 12.2 mmol/L. The soluble phosphate of rock phosphorus was enhanced obviously by enzyme AP3 treatment for 24 h, and by inoculation of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* YP6 for 7 days. [Conclusion] Alkaline phosphatase AP3 can be used as a phosphorus-solubilizing enzyme.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens*, Phosphorus-solubilizing enzyme, Alkaline phosphatase

**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: September 15, 2017; Accepted: December 28, 2017; Published online (www.cnki.net): May 10, 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: 2017-09-15; 接受日期: 2017-12-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-05-10

解磷微生物 (Phosphate-solubilizing microorganisms) 主要存在于土壤和植物根际, 具有促进土壤中的难溶磷转化为有效磷的作用, 进而减少磷肥的使用, 提高磷资源的利用率<sup>[1]</sup>。解磷微生物主要有真菌、细菌和放线菌等, 其中多数为芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 的解磷细菌<sup>[2]</sup>。解磷微生物可分为无机解磷微生物和有机解磷微生物, 大部分微生物可以通过产生有机酸分解磷灰石释放  $\text{PO}_4^{3-}$ <sup>[3]</sup>。无机解磷微生物主要通过分泌草酸、琥珀酸、乳酸、柠檬酸、延胡索酸等有机酸, 降低环境的 pH, 分解磷酸钙、磷灰石等无机磷化合物, 释放有效磷。Bolan 等研究了小分子有机酸的促磷作用, 发现有机酸的存在可以促进植物对土壤中磷的吸收, 提高磷资源的利用率<sup>[4]</sup>。刘胜亮等发现不同有机酸对速效磷的影响作用依次为丙酮酸>酒石酸>乳酸>乙酸>草酸<sup>[5]</sup>。有机解磷微生物的解磷机制主要是酶解作用, 在缺磷环境下, 通过分泌磷酸酯酶、植酸酶等酶类促进有效磷的释放<sup>[6]</sup>。植酸酶通过释放植酸磷来增加有效磷的含量; 磷酸酯酶则通过去磷酸化或断裂有机磷物质中的磷酸键释放有效磷, 根据其最适作用 pH 可分为酸性磷酸酯酶 (Acid phosphatase) 和碱性磷酸酯酶 (Alkaline phosphatase)。Wanner 等在 1982 年首次报道将解磷基因 (*psi*) 转入大肠杆菌中并提高了大肠杆菌的解磷能力<sup>[7]</sup>。Ludtke 等发现大肠杆菌中 *phoA* 编码碱性磷酸酯酶, 当细胞处于缺磷状态时, *phoA* 编码大量碱性磷酸酯酶分泌到细胞周质空间<sup>[8]</sup>。Siddavattam 等发现假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) 和黄杆菌 (*Flavobacterium* sp.) 中都有编码解磷酶的基因<sup>[9]</sup>。钟传青等<sup>[10]</sup>发现, 微生物的生长发育过程中释放的有机酸和磷酸酯酶可以促进难溶磷转化为有效磷。土壤中解磷微生物众多, 解磷机制复杂, 有的微生物仅靠一种溶磷机制, 有的微生物通过多种机制相互作用<sup>[11]</sup>。研究解磷微生物的传统方法不能彻底了解解磷菌的溶磷机制, 需要结合现代分子生物技术, 深入了解与解磷有关的基因<sup>[12]</sup>。

为提高土壤中累积的磷资源的利用效率, 本实

验从贵州磷矿植物根际得到了具有明显溶磷能力的解淀粉芽孢杆菌 YP6 (*Bacillus amyloliquefaciens* YP6)。为研究 YP6 的解磷机制, 探究 YP6 的溶磷能力与其分泌的碱性磷酸酯酶的关系, 将 YP6 中编码碱性磷酸酯酶的基因 AP3 克隆并转化到表达宿主大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 研究了 AP3 的酶学性质并验证其促磷能力。同时研究了菌株对磷矿粉以及土壤样品的促磷作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

YP6 (GenBank 登录号: KP326355.1) 筛选自贵州磷矿植物根际, 由实验室自主保存。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

分子生物学所需试剂、表达载体 pCold II、大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21(DE3), TaKaRa (大连) 公司。磷矿粉, 湖北襄阳隆福矿业有限公司; 土样, 江南大学百草园; 对硝基磷酸苯二钠和磷酸苯二钠, 宝生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂为分析纯。

PCR 仪, 美国应用生物系统公司; 核酸电泳仪和蛋白电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像仪, 美国伯乐公司; 超声破碎仪, 美国必能信公司; 紫外分光光度计, 日本日立公司; 酶标仪, 美国伯腾仪器公司; 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。

#### 1.1.3 培养基和溶液

(1) LB 液体培养基<sup>[13]</sup>, 固体培养基添加 2% 琼脂。

(2) 无机磷固体培养基<sup>[14]</sup>, 磷源替换为羟基磷灰石。

(3) 结合缓冲液: 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4);

(4) 洗脱缓冲液: 500 mmol/L 咪唑, 500 mmol/L NaCl, 20 mmol/L 磷酸钠 (pH 7.4)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $\text{PO}_4^{3-}$ 含量与磷酸酯酶酶活性检测

YP6 接种于 50 mL LB 培养液中, 30 °C、200 r/min

培养 18 h 后,将不同含量(1%–10%)的种子液接种于含 2%磷矿粉的 LB 培养基,以加入等量灭菌培养基为对照,30 °C、200 r/min 培养 2 d 后于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min,收集上清液测定磷酸酯酶酶活及  $\text{PO}_4^{3-}$  的含量,根据对照计算有效磷的增加量。溶液中可溶磷  $\text{PO}_4^{3-}$  的含量通过钼酸铵比色法绘制标准曲线并检测<sup>[15]</sup>。磷酸酯酶活性分别在 pH 5.0 (柠檬酸盐缓冲液)、pH 7.0 (Tris-HCl 缓冲液)和 pH 10.0 (乙二醇胺缓冲液)通过磷酸苯二钠比色法<sup>[16]</sup>检测。以 pNPP 为底物可通过对硝基磷酸苯二钠比色法检测<sup>[17]</sup>。

### 1.2.2 AP3 的克隆表达

提取 YP6 菌株 16S rRNA 基因进行序列比对,得到与 YP6 相似度达到 99% 的菌株 *Bacillus amyloliquefaciens* XH7 (登录号: CP002927.1)。根据 XH7 的磷酸酯酶基因序列,采用 Primer 5.0 设计引物并添加保护碱基和酶切位点,上游引物为: 5'-GCCGGAGCTCATGAGTTTATTTAAACAGGTT CGAT-3';下游引物为:5'-GCCGCTGCAGTTATTTG CCGCTTTTAAAGATG-3',下划线处为酶切位点 (*Sac* I 和 *Pst* I)。以 YP6 的全基因组为模板,采用 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶体系进行 PCR 扩增。反应体系: 5×Prime STAR 缓冲液( $\text{Mg}^{2+}$ , 5 mmol/L) 10  $\mu\text{L}$ , dNTPs (2.5 mmol/L) 4  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物 (10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板(100 ng/ $\mu\text{L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,添加 ddH<sub>2</sub>O 至 50  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环。PCR 产物纯化后和 pCold II 载体进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 连接过夜,转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,在含氨苄霉素(100  $\mu\text{g/mL}$ )的 LB 平板上筛选阳性菌株,测序确认转化后,提取质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3)。

### 1.2.3 生物信息学初步分析 AP3 氨基酸序列

通过 ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测 AP3 蛋白序列的基本理化性质;通过 ClustalW 和 MEGA 5.0 软件对 GenBank 上不同类型磷酸酯酶构建基于氨基酸序列的进化树。

### 1.2.4 诱导表达及蛋白纯化

10  $\mu\text{L}$  重组 BL21(DE3)菌株(RSAP3)加入 3 mL 含氨苄的 LB 培养基,以 BL21(DE3)和空载[转入 pCold II 质粒的 BL21(DE3), Bp]为对照,37 °C、200 r/min 培养过夜后加入 50 mL 含氨苄的 LB 培养基中至  $OD_{600}$  为 0.4–0.6, 15 °C 下静置 30 min。加入 20  $\mu\text{L}$  0.5 mol/L 的 IPTG,以不加 IPTG 的菌株作对照。收集菌液 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min,弃上清,加入 5 mL Tris-HCl 缓冲液重悬菌体,超声波破碎 20 min,破 2 s 停 3 s, 30% 功率。同条件离心 10 min 取上清,得到磷酸酯酶粗酶液。

### 1.2.5 酶活测定及 SDS-PAGE 分析

粗酶液用磷酸苯二钠比色法在不同酸碱条件下测定是否具有磷酸酯酶酶活性后,以结合液平衡镍柱(HisTrap HP),用洗脱液梯度洗脱获取 AP3 纯化产物。再经脱盐柱(HiTrap<sup>TM</sup>)脱盐。纯化后的蛋白用 Bradford 法<sup>[18]</sup>测定浓度,通过 12% SDS-PAGE 凝胶电泳(SDS-PAGE)<sup>[19]</sup>确定蛋白是否纯化。

### 1.2.6 酶学性质分析

温度、pH 对 AP3 酶活性的影响:不同温度(0–80 °C)和 pH 10.0 下,测定 AP3 的最适反应温度。最适反应温度下,配制不同 pH 的缓冲液(pH 3.0–12.0),测定 AP3 最适反应 pH。酶的热稳定性:最适 pH 下,0–80 °C 孵育 1 h 后测定 AP3 活性。pH 稳定性:最适温度下,分别在 pH 3.0–12.0 下保持 1 h,测定 AP3 的剩余活性。以标准体系下 AP3 最高酶活为 100%,计算相对酶活。研究 10 种金属离子(0–10.0 mmol/L)对 AP3 活性的影响,以不加金属离子的反应液为 100%,以 0.02 mol/L pNPP 为底物,测定 AP3 的相对酶活。实验研究了常见的抑制剂(EDTA、组氨酸、半胱氨酸、丝氨酸)在不同浓度下对 AP3 的影响。由于在配制碱性缓冲液(pH 10.3)时发现,使用磷酸缓冲液时 AP3 的酶活性远低于乙二醇胺缓冲液中的酶活,因此实验探究了磷酸氢二钠对 AP3 的影响。分别以不同浓度(0.01–0.50 mol/L)的 pNPP 和磷酸苯二钠为底物,添加最佳金属离子浓度的溶液,在最适反应 pH 和温度下,测定不同底物浓度下的酶活,根据米氏方程变形  $1/V=1/V_{\max}+K_m/V_{\max}\cdot(1/S)$ ,用双倒

数作图法, 计算  $V_m$ 、 $K_m$ 、 $k_{cat}$  以及  $k_{cat}/K_m$ 。

### 1.2.7 解磷菌的平板溶磷

分别取 5  $\mu$ L Bp、YP6、RSAP3 菌株种子液, 点样于以羟基磷灰石为唯一磷源的无机磷固体培养基, 37  $^{\circ}$ C 倒置培养 2 d 后观察其是否产生解磷圈。

### 1.2.8 纯酶溶磷及菌株对磷矿粉和土样的解磷作用

在蒸馏水中加入 1% 的磷矿粉, 取 1 mL 加入 50  $\mu$ L 纯化后的 AP3 酶液, 以等量灭活酶液为对照, 在最适条件下分别反应 0.5、12、24 h, 离心后取上清液检测溶液中 pH 的变化并测定反应体系中  $PO_4^{3-}$  的含量。将 Bp、YP6、RSAP3 的种子液接入 50 mL 含 1% 磷矿粉的 LB 培养基中, 按 1.2.4 中方法诱导表达 1 d, 3 株菌转入 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 进行培养, 以加入等量不含菌体的培养基为对照, 培养 1–7 d, 取样测定培养基中  $PO_4^{3-}$  的含量。

将不同比例(0.5%、1%、2%、3%、4%、5%)灭菌烘干研磨后的土样加入 50 mL LB 培养基, 灭菌后接入 5% 的 YP6 种子液, 30  $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 1–7 d, 以不加菌株为对照, 计算样品中  $PO_4^{3-}$  的增长量。

## 2 结果与分析

### 2.1 YP6 的溶磷能力与 AP3 的关系

样品中菌体含量越高, 磷酸酯酶酶活越高。在 pH 5.0、7.0 和 10.0 下均能检测到酶活, pH 10.0 时

的酶活性最高, 因此选取碱性磷酸酯酶作为研究对象。图 1A 表明, 在含有 2% 磷矿粉的培养基中, 样品中碱性磷酸酯酶含量越高, 体系中检测到的  $PO_4^{3-}$  含量越高, 在接种量大于 5% 的样品中, 碱性磷酸酯酶酶活无明显变化, 可能与培养基中菌种量过大、菌种过饱和有关。接种 10% 菌株的样品中  $PO_4^{3-}$  含量最高, 为 92.11 mg/L。

### 2.2 诱导表达及蛋白纯化结果

AP3 异源表达宿主构建后, 经诱导表达和 SDS-PAGE 分析, 如图 1B 所示, 泳道 3 为多次纯化并脱盐后的 AP3, 与 ExPASy 预测一致, 在 49.6 kD 处有单一明显的条带。经计算, 纯化后的 AP3 最大反应速率  $V_m$  为 4 033.4  $\mu$ mol/(min·mg)。经系统发育树分析, AP3 与来自不同种芽孢杆菌的碱性磷酸酯酶相似度达 99%, 如解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、蜡样芽孢杆菌等。

### 2.3 酶学性质分析

如图 2A 所示, AP3 最适 pH 为 10.3, 在 pH 8.0–11.0 范围内具有 50% 以上酶活性, 在 pH < 3.0 及 pH > 12.0 的条件下几乎失活。如图 2B 所示, 最适反应温度为 40  $^{\circ}$ C, 在 0–55  $^{\circ}$ C 内酶活性仍保持 55% 以上。AP3 不耐高温, 在低温环境下酶活不易损失, 因此 AP3 可能为冷活性碱性磷酸酯酶。

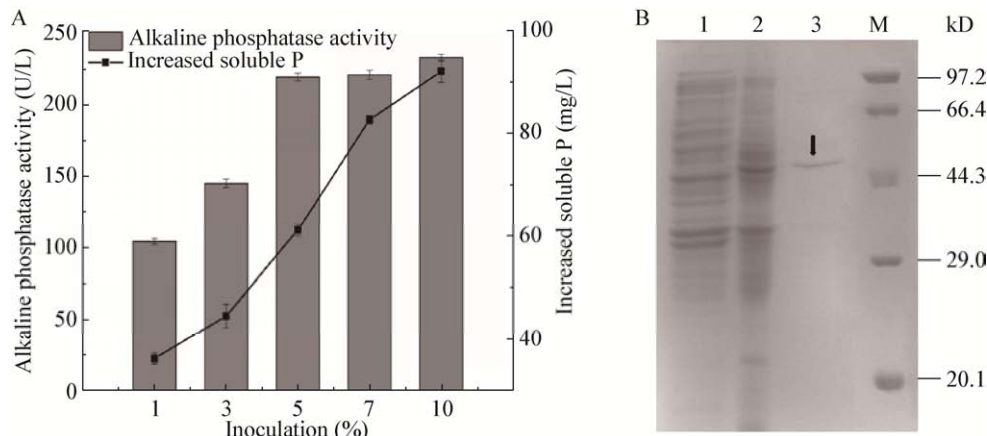


图 1 碱性磷酸酯酶对  $PO_4^{3-}$  含量的影响及 AP3 的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 Effect of AP3 on the content of  $PO_4^{3-}$  and SDS-PAGE analysis of AP3

注: A: 碱性磷酸酯酶与  $PO_4^{3-}$  含量的关系; B: 蛋白纯化 SDS-PAGE 分析。1: 空载 Bp; 2: 粗酶液; 3: AP3, 黑色箭头指示为目的蛋白; M: 蛋白 Marker。

Note: A: The relationship between the content of alkaline phosphatase and  $PO_4^{3-}$ ; B: SDS-PAGE analysis of AP3. 1: Bp; 2: Crude enzyme; 3: Purified fraction of AP3; M: Protein marker.

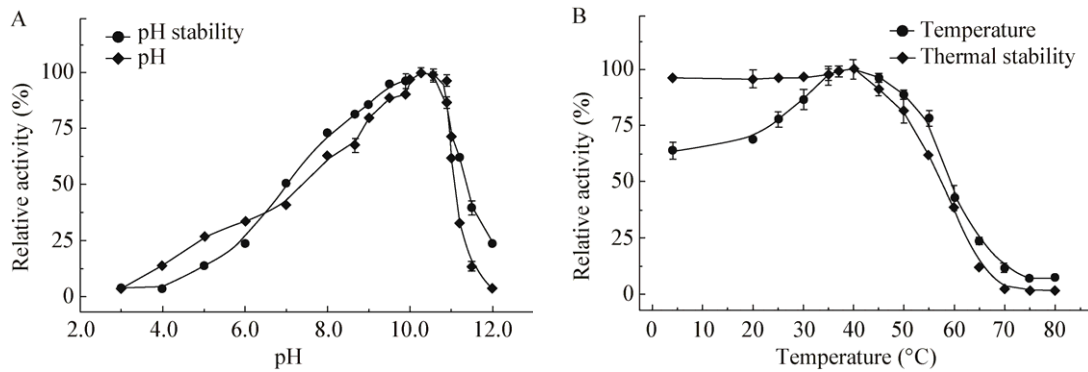


图2 酶学性质分析

Figure 2 Enzymatic properties of AP3

注: A: pH对AP3活性的影响及pH稳定性; B: 温度对AP3活性的影响及温度稳定性。

Note: A: Optimum pH and pH stability of AP3; B: Optimum temperature and thermal stability of AP3.

表1所示金属离子对AP3的影响,  $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ 、 $Cu^{2+}$ 以及低浓度的 $Zn^{2+}$ 对AP3有激活作用,  $Fe^{3+}$ 无明显影响, 其中 $Mn^{2+}$ 具有明显的抑制作用, 其他4种金属离子对AP3均有一定的抑制作用, 最佳金属离子为10.0 mmol/L的 $Mg^{2+}$ 。

不同浓度的抑制剂对AP3的影响如图3所示, EDTA和半胱氨酸对AP3有强烈的抑制作用, 在0.5 mmol/L下抑制率近100%, 磷酸氢二钠和组氨酸在<1 mmol/L的浓度下对AP3抑制不明显, 当浓度>1 mmol/L有明显的抑制作用。丝氨酸在浓度<20 mmol/L时对AP3的抑制作用不明显, 当浓

度达到100 mmol/L时, 相对酶活<10%。

分别以磷酸苯二钠和pNPP为底物, 根据双倒数曲线, 计算出各项参数如表2所示。 $V_m$ 分别为3 068.2和4 033.4  $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ ,  $K_m$ 分别为101.2和12.2 mmol/L。可见AP3对pNPP具有更高的特异性。

## 2.4 促磷能力分析

图4C中YP6和RSAP3形成明显的解磷圈, 说明YP6和RSAP3具有将难溶磷转化为有效磷的能力。菌株Bp可以在平板上生长, 但不能形成解磷圈。图4A中由于磷矿粉存在部分有效磷, 造成加入灭活酶液的样品也检测到部分有效磷,

表1 金属离子对AP3的影响

Table 1 The effect of mental ions on AP3

Metal ions	Ions concentration (mmol/L)						
	0.0	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
$Mg^{2+}$	100.00	108.58±0.12	109.03±0.76	113.55±0.32	119.22±0.21	123.27±0.34	130.66±0.50
$Ca^{2+}$	100.00	102.55±0.31	109.08±0.31	110.11±0.25	113.40±2.40	116.45±1.70	120.49±0.15
$Ba^{2+}$	100.00	101.11±0.60	101.62±0.86	103.37±0.81	110.05±1.41	109.43±0.30	56.31±0.15
$Mn^{2+}$	100.00	54.20±1.62	55.71±1.44	66.95±1.30	75.54±2.83	86.87±0.99	56.31±0.15
$Cu^{2+}$	100.00	103.56±0.91	106.27±2.67	118.64±0.67	119.41±2.11	121.42±0.68	118.10±0.44
$Fe^{2+}$	100.00	97.56±0.76	92.96±2.87	75.27±0.32	71.75±0.99	61.29±1.54	21.51±0.21
$Fe^{3+}$	100.00	103.15±0.12	103.37±1.36	103.41±0.10	103.08±0.53	103.41±0.27	103.78±2.99
$Zn^{2+}$	100.00	113.92±0.82	111.81±1.11	92.25±0.60	75.04±0.90	88.25±1.72	97.50±0.86
$Ni^{2+}$	100.00	102.81±1.36	100.43±0.55	96.67±1.16	95.73±0.87	93.64±1.36	85.70±0.57
$Co^{2+}$	100.00	103.61±0.35	103.51±1.56	110.23±1.15	96.39±0.72	99.76±0.80	71.25±2.58

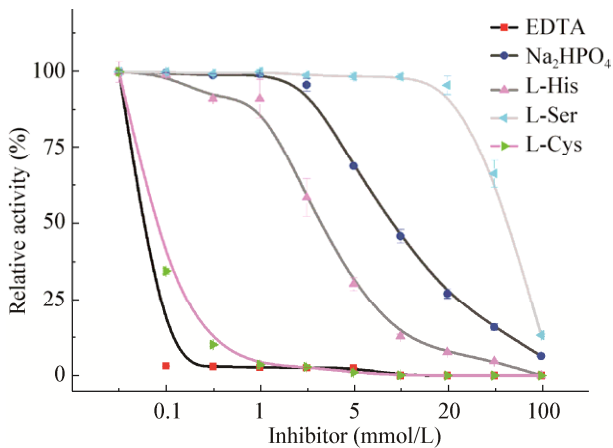


图 3 常见抑制剂对 AP3 的影响

Figure 3 The effects of five common inhibitors on AP3

其含量随时间并无明显变化,说明灭活酶液无促磷作用。含有 AP3 酶液的样品中有效磷含量不断增加,并检测到样品中的 pH 并没有明显变化,维持在 pH 7.0 左右。样品中的  $\text{PO}_4^{3-}$  含量在 24 h 后为 59.72 mg/L,达到对照组的 2.28 倍,增加了 33.53 mg/L。图 4B 中,对照中同样检测到部分可溶磷,含量并无变化。接种 YP6 样品中的  $\text{PO}_4^{3-}$  含量不断增大,在第 7 天达到 109.52 mg/L,是对照的 4.1 倍。RSAP3 菌株中的  $\text{PO}_4^{3-}$  含量最高,随时间增加在第 7 天达到 135.12 mg/L,为对照组的 5.1 倍。接种 Bp 的样品中也检测到少量有效磷,在 1-4 d 呈现略微增加趋势,第 4 天后不再增加,并在第 6 天开始下降,这些有效磷可能为菌株生长所需而产生。对照组中 pH 并无变化,接入菌株的实验组中溶液 pH 略有下降,在第 7 天 3 组实验组中的 pH 在 6.5 左右,因此 pH 对溶磷的影响有待进一步研究。图 4D 中 YP6 在土样中的溶磷能力与时间呈正相关,在含有 1.0% 土样的条件下,溶磷能力最高,

第 7 天有效磷的增加量为 79.27 mg/L。在含有 5% 土样的条件下,土壤中存在的可溶磷含量较高,可溶磷的增加量最少,可能由于在高含量有效磷存在的环境中,菌体并不处于磷胁迫状态,促使其溶解磷能力下降。

### 3 讨论

应用解磷微生物解决土壤中磷资源富集的现状,提高磷资源的利用效率,已逐渐引起关注。Antoun 等研究发现根际微生物是丰富的解磷微生物库,54% 的根际微生物具有溶磷作用<sup>[20]</sup>。杜雷等从蔬菜大棚作物根际分离到一株高效解磷菌,属于根瘤菌属(*Ensifer*),在以磷酸钙为磷源的无机磷培养基中发酵 7 d,溶磷能力达到 443.11 mg/L<sup>[21]</sup>。刘荣昌等将欧文氏菌属(*Erwinia*)的解磷菌作为菌肥施入土壤,发现该菌对小麦和大豆均有增产作用<sup>[22]</sup>。目前研究解磷菌的主要磷源为磷酸钙,本实验所用菌株 YP6 首次在以磷矿粉为 2% 磷源条件下,发酵 7 d 后有效磷含量达到 109.52 mg/L,重组 RSAP3 菌株中的有效磷含量在第 7 天达到 135.12 mg/L。为了提高 YP6 的溶磷能力,有待进一步优化溶磷发酵条件。

微生物解磷机制十分复杂,主要机制为有机酸、植酸酶以及磷酸酯酶的作用。银婷婷等发现 pH 的降低、菌体数量和葡萄糖的含量是葡萄糖杆菌 qzr14 产生可溶磷的主要原因<sup>[23]</sup>。王同等从红壤中筛选得到的菌株 B1 主要通过分泌苹果酸和草酸降低 pH,提高有效磷的含量<sup>[24]</sup>。Narsian 等认为溶磷微生物主要的溶磷机制是产生大量的有机酸和磷酸酯酶<sup>[25]</sup>。管国强等通过以磷酸钙为磷源,对伯克霍尔德里氏菌 P0417 的溶磷机制进行分析,发现除草酸和琥珀酸外,磷酸酯酶也有一定的解磷效果<sup>[26]</sup>。

表 2 AP3 酶学动力学参数

Table 2 The enzyme kinetics parameters of AP3

Substrates	$V_m$ ( $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ )	$K_m$ (mmol/L)	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{L}/(\text{s}\cdot\text{mol})$ )
磷酸苯二钠 Disodium phenyl phosphate hydrate	3 068.2±27.4	101.2±3.3	$2.5\times 10^6\pm 0.1\times 10^4$	$2.5\times 10^7\pm 0.1\times 10^6$
对硝基磷酸苯二钠 p-Nitrophenyl phosphate	4 033.4±45.5	12.2±1.8	$3.3\times 10^6\pm 0.2\times 10^4$	$2.8\times 10^8\pm 0.2\times 10^7$

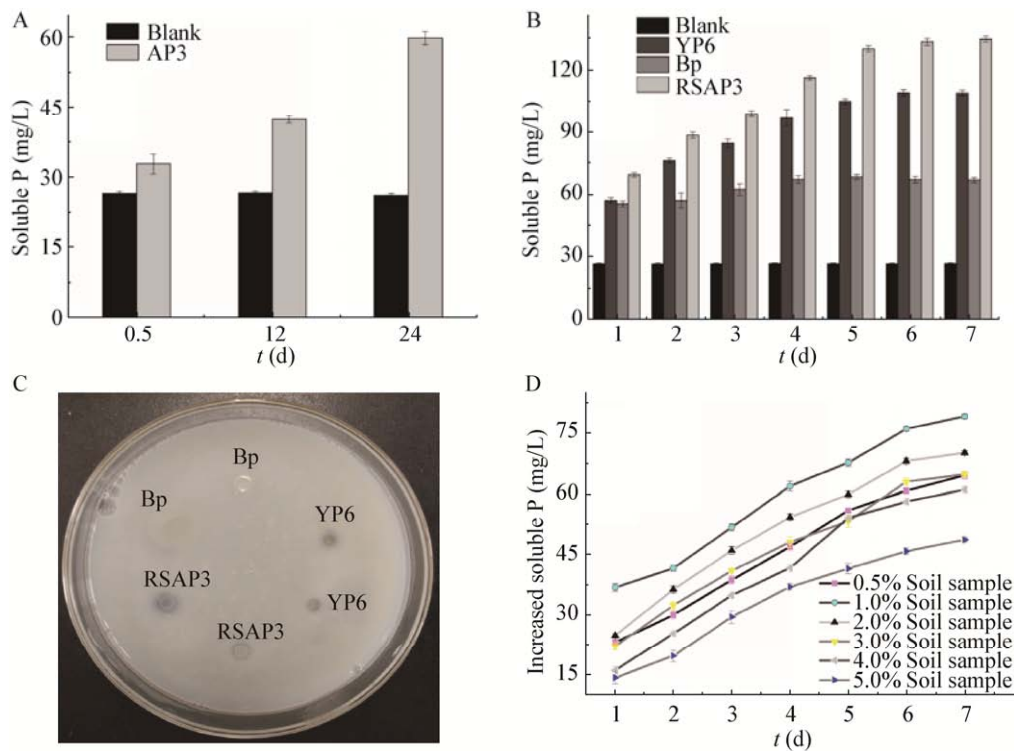


图4 促磷能力分析

**Figure 4 The analysis of solubilizing-phosphate**

注: A: AP3 对磷矿粉的溶磷作用; B: 菌株对磷矿粉的溶磷作用; C: 菌株在无机磷平板上的溶磷圈; D: YP6 对土样的溶磷作用。  
 Note: A: The solubilizing-phosphate effect of AP3 on phosphate rock; B: The solubilizing-phosphate effect of strains on phosphate rock; C: The solubilizing-phosphate zone of strains on inorganic phosphorus medium; D: The solubilizing-phosphate effect of YP6 on soil sample.

为深入认识解磷机制,需结合解磷基因及相关酶的研究,本实验中发现 YP6 所分泌的碱性磷酸酯酶与促进溶磷能力有关,将其解磷基因克隆到大肠杆菌 BL21(DE3)中使其表达,并首次使用碱性磷酸酯酶 AP3 作用磷矿粉,证明了 AP3 的促磷能力。AP3 为碱性磷酸酯酶,酸性磷酸酯酶是否更适合释放有效磷有待进一步探究。溶磷微生物作为菌肥提高土壤中可溶磷含量,是研究溶磷微生物的主要目的。本实验探讨了不同含量土壤样品中 YP6 的溶磷能力。在 1% 土样的条件下,第 7 天有效磷增加 79.27 mg/L。尽管 YP6 对土壤溶磷效果明显,仍需要施用到作物中,进一步研究作物的生长和产量等。

**4 结论**

本研究从具有高溶磷能力的解淀粉芽孢杆菌 YP6 中克隆出磷酸酯酶 AP3。酶学性质分析表明 AP3 是碱性磷酸酯酶,最适 pH 为 10.3,最适反应

温度为 40 °C,对 pNPP 和磷酸苯二钠亲和力高( $K_m$  分别为 12.2 和 101.2 mmol/L)。同时证明了 AP3 对磷矿粉具有一定的促磷能力。研究结果表明 YP6 具有潜在的提高土壤中磷资源利用率的值,同时 AP3 对磷矿粉的解磷作用也丰富了对微生物解磷机制的认识。

**REFERENCES**

- [1] Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1992, 24(4): 389-395
- [2] Zhao XR, Lin QM. A review of phosphate-dissolving microorganisms[J]. *Soils and Fertilizers*, 2001(3): 7-11 (in Chinese) 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
- [3] Panhwar QA, Jusop S, Naher UA, et al. Application of potential phosphate-solubilizing bacteria and organic acids on phosphate solubilization from phosphate rock in aerobic rice[J]. *The Scientific World Journal*, 2013, 2013: 272409
- [4] Bolan NS, Naidu R, Mahimairaja S, et al. Influence of low-molecular-weight organic acids on the solubilization of phosphates[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 1994, 18(4):

- 311-319
- [5] 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
- [6] Zhang AM, Li NK, Zhao GY, et al. Research progress on the phosphate-solubilizing and potassium-solubilizing microorganisms[J]. Journal of Hebei University (Natural Science Edition), 2015, 35(4): 442-448 (in Chinese)  
张爱民, 李乃康, 赵钢勇, 等. 土壤中解磷、解钾微生物研究进展[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2015, 35(4): 442-448
- [7] Wanner BL, McSharry R. Phosphate-controlled gene expression in *Escherichia coli* K12 using MudI-directed lacZ fusions[J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 158(3): 347-363
- [8] Ludtke D, Bernstein J, Hamilton C, et al. Identification of the *phoM* gene product and its regulation in *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1984, 159(1): 19-25
- [9] Siddavattam D, Khajamohiddin S, Manavathi B, et al. Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (*opd*) gene cluster found in *Flavobacterium* sp.[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(5): 2533-2539
- [10] Zhong CQ, Huang WY. Comparison in P-solubilizing effects between different P-solubilizing microbes and variation of activities of their phosphatases[J]. Acta Pedologica Sinica, 2005, 42(2): 286-294 (in Chinese)  
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[J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 286-294
- [11] Wu HY, Jin RD, Fan ZW, et al. Mechanism of Solubilizing Phosphate by *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2014, 36(2): 171-175 (in Chinese)  
吴海燕, 金荣德, 范作伟, 等. 解磷巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的溶磷机理探讨[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(2): 171-175
- [12] Sheng R, Xiao HA, Tan ZJ, et al. Advance in phosphorus-dissolving microorganisms and the mechanisms on phosphorus transformation and availability[J]. Chinese Journal of Soil Science, 2010, 41(6): 1505-1510 (in Chinese)  
盛荣, 肖和艾, 谭周进, 等. 土壤解磷微生物及其磷素有效性转化机理研究进展[J]. 土壤通报, 2010, 41(6): 1505-1510
- [13] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. Cold spring harbor laboratory press, 1989
- [14] Qin LJ, Yang LF, Yuan K. Screening of high-efficiency phosphate solubilizing bacteria from rhizosphere of tropical pasture and their optimal cultural conditions[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2009, 30(11): 1630-1636 (in Chinese)  
覃丽金, 杨礼富, 袁坤, 等. 10 种热带牧草根际高效解磷细菌的筛选及其培养条件[J]. 热带作物学报, 2009, 30(11): 1630-1636
- [15] King EJ. The colorimetric determination of phosphorus[J]. Biochemical Journal, 1932, 26(2): 292-297
- [16] Zhao LP, Jiang Y. The discussion of soil phosphatase activity determination method[J]. Chinese Journal of Soil Science, 1986, 17(3): 138-141 (in Chinese)  
赵兰坡, 姜岩. 土壤磷酸酶活性测定方法的探讨[J]. 土壤通报, 1986, 17(3): 138-141
- [17] Su YB, Lin C, Zhang FS, et al. Effect of arbuscular mycorrhiza fungi (*Glomus mosseae*, *Glomus versiforme*, *Gigaspora margarita* and *Gigaspora rosea*) on phosphatase activities and soil[J]. Soils, 2003, 35(4): 334-338,343 (in Chinese)  
苏友波, 林春, 张福锁, 等. 不同 AM 菌根菌分泌的磷酸酶对根际土壤有机磷的影响[J]. 土壤, 2003, 35(4): 334-338,343
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227(5259): 680-685
- [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: 57-67
- [21] Du L, Wang SP, Chen G, et al. Isolation and identification of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its phosphate-solubilizing capacity[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2017(3): 136-141 (in Chinese)  
杜雷, 王素萍, 陈钢, 等. 一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3): 136-141
- [22] Liu RC, Li FT, Hao ZR, et al. Analysis on high yield reason of wheat inoculated with associative nitrogen-fixing bacteria[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 1993, 8(2): 73-77 (in Chinese)  
刘荣昌, 李凤汀, 郝正然, 等. 小麦接种联合固氮菌增产原因分析[J]. 华北农学报, 1993, 8(2): 73-77
- [23] Yin TT, Wang JJ, Liu Y, et al. The screening of efficient phosphorus-solubilizing bacteria and the primary study on its mechanism of plant-growth-promoting[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(12): 234-242 (in Chinese)  
银婷婷, 王敬敬, 柳影, 等. 高效解磷菌的筛选及其促生机制的初步研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31(12): 234-242
- [24] 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
- [25] Narsian V, Patel HH. *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(4): 559-565
- [26] 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