

一株高效解磷菌的筛选鉴定及溶磷性能

高威¹, 左振宇^{1,2}, 李凌凌^{*1,2}, 周圣玉¹, 聂静雨¹, 陈慧雯¹

1 武汉科技大学化学与化工学院, 湖北 武汉 430081

2 武汉科技大学煤转化与新型炭材料湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430081

高威, 左振宇, 李凌凌, 周圣玉, 聂静雨, 陈慧雯. 一株高效解磷菌的筛选鉴定及溶磷性能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3873-3889

Gao Wei, Zuo Zhenyu, Li Lingling, Zhou Shengyu, Nie Jingyu, Chen Huiwen. Isolation, identification, and characterization of a phosphate-solubilizing bacterial strain[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3873-3889

摘 要:【背景】土壤中大部分磷元素是以难溶性磷酸盐的形式存在, 不能被农作物有效利用, 而传统化学肥料会带来环境污染等问题。【目的】解决土壤磷缺失现状, 开发新型、安全、高效的微生物菌肥。【方法】取武汉科技大学图书馆后土壤为试验材料, 筛选出一株高效解磷菌。通过个体形态鉴定、生理生化鉴定、16S rRNA 基因序列分析鉴定菌株, 以 NBRIP 为基础培养基进行条件优化, 借助高效液相色谱进行细菌解磷机理探究。【结果】所筛选的高效解磷菌株为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)。在 20 种氨基酸中, D-蛋氨酸对菌株的生长和溶磷促进作用最好, 促进效果达到 19.09%和 16.16%, 甲酸钠对菌株的生长和溶磷有抑制效果, 抑制效果达到 39.08%和 10.66%。该菌株通过分泌葡萄糖醛酸、D-L-苹果酸等有机酸溶解环境中的磷酸盐, 将菌株制成菌肥对辣椒幼苗有明显的促生长作用。【结论】利用唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)分泌有机酸溶解土壤中的磷酸盐, 可为生物肥料的制备和应用提供一定的理论参考。

关键词: 解磷菌; 解磷微生物; 唐菖蒲伯克霍尔德氏菌; 菌肥

基金项目: 湖北省教育厅科学技术研究计划(D20191101)

Supported by: Science and Technology Research Project of Hubei Provincial Department of Education (D20191101)

*Corresponding author: E-mail: lilingling@wust.edu.cn

Received: 2022-01-16; Accepted: 2022-03-05; Published online: 2022-04-14

Isolation, identification, and characterization of a phosphate-solubilizing bacterial strain

GAO Wei¹, ZUO Zhenyu^{1,2}, LI Lingling^{*1,2}, ZHOU Shengyu¹, NIE Jingyu¹, CHEN Huiwen¹

¹ School of Chemistry and Chemical Engineering, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei, China

² Key Laboratory of Hubei Province for Coal Conversion and New Carbon Materials, Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, Hubei, China

Abstract: [Background] Most of the phosphorus in the soil exists in the form of insoluble phosphate, which is unavailable to crops, and traditional chemical fertilizer causes environmental pollution. [Objective] To tackle soil phosphorus deficiency and develop a safe and efficient microbial fertilizer. [Methods] An efficient phosphate-solubilizing bacterial strain was screened out from the soil behind the library of Wuhan University of Science and Technology and identified by morphological observation, determination of physiological and biochemical indexes, and 16S rRNA gene sequencing. The phosphate-solubilizing conditions were optimized based on NBRIP medium, and the phosphorus-solubilizing mechanism was explored by high performance liquid chromatography. [Results] The strain was identified as *Burkholderia gladioli*. Among the 20 amino acids, D-methionine was prominent in promoting the growth and phosphate solubilization of the strain, improving the growth and solubilized phosphate by 19.09% and 16.16%, respectively. Sodium formate inhibited the growth and phosphorus dissolution of the strain, with the inhibition rate of 39.08% and 10.66%, respectively. The strain dissolved phosphate in the environment by secreting organic acids such as glucuronic acid and D-L-malic acid. The fertilizer prepared with the strain could significantly promote the growth of pepper seedlings. [Conclusion] *B. gladioli* secretes organic acids to dissolve phosphate in the soil, which lays a theoretical basis for the preparation and application of biological fertilizer.

Keywords: phosphate-solubilizing bacteria; phosphate-solubilizing microorganism; *Burkholderia gladioli*; bacterial fertilizer

磷是植物生长必需的大量元素，在植物生长发育过程中起着至关重要的作用。我国大面积的土地都存在缺磷的情况，土壤中大部分的磷都是以难溶磷的形式存在，在农业种植过程中，一般采取施加磷肥的形式补充磷元素^[1]。若能够将土壤中难溶的无机磷活化出来并充分利用，便能够解决目前土壤磷缺失现状。目前使用的化学肥料虽能够很好地解决这一问题，但会带来环境污染问题。通过微生物活化的方

法将土壤中难溶的磷释放出来，从而促进植物的生长，将菌株制备成生物肥料是一种绿色、高效、环保的方法^[2]。

目前的研究主要采取基因修饰增强酶活、添加外源物质、多种菌株混合接种等方法促进细菌的产酸效果，本实验从土壤中筛选解磷菌，以氨基酸和甲酸钠作为外加物质，探究它们对解磷菌的生长和解磷的影响及其解磷机理，以期对农业生产中的磷资源利用提供理论依据和

技术指导^[3]。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 培 养 基

NBRIP 液体培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{MgCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, KCl 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.15。pH 6.8–7.0, 配制固体培养基时加入琼脂 20.0 g/L。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。配制固体培养基时加入琼脂 20.0 g/L。

阿须贝(Ashby)无氮液体培养基(g/L): 甘露醇 10.0, CaCO_3 5.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.1, KH_2PO_4 0.2, NaCl 0.2^[4]。

Salkowski 比色液(g/L): 4.5 g FeCl_3 溶于 10.8 mol/L 浓硫酸中, 冷却后加去离子水至 1 L^[5]。

1.1.2 主要试剂和仪器

葡萄糖、琼脂粉和 KH_2PO_4 , 国药集团化学试剂有限公司; 蛋白胨, 赛默飞世尔科技公司。酶标仪, 上海仪电分析仪器有限公司; 高效液相色谱仪, 安捷伦公司; 普通光学显微镜, 北京泰克仪器有限公司; 引物合成和测序工作由武汉擎科创新生物科技有限公司完成。

1.2 方 法

1.2.1 解磷菌的筛选

土壤取自武汉科技大学图书馆后空地, 深度为 0–20 cm 土层, 装进无菌自封袋。称取土样 10 g, 除去石块后放入盛 100 mL 去离子水的锥形瓶中摇匀。用移液枪取 1 mL 土壤悬浮液, 配制成 10^{-3} 、 10^{-4} 和 10^{-5} 的土壤稀释溶液。

1.2.2 解磷菌解磷能力的测定

(1) 溶磷指数(solubilization index, SI)

将菌液稀释 10^3 倍, 涂布到 NBRIP 固体培养基中, 在 37 °C 培养箱中培养 4 d, 测量菌株

Y 的溶磷圈直径(D)和菌落直径(d), 根据 $SI=D/d$ 计算解磷菌的 SI 值^[6]。

(2) 菌液中可溶磷含量的测定

使用磷钒钼黄比色法测定清液中的可溶磷含量^[7–8]。

1.2.3 菌株 Y 的鉴定

(1) 个体形态观察

在 LB 固体培养基上将菌株 Y 平板划线, 观察形态特征, 进行半固体 LB 穿刺实验和革兰氏染色^[9]。

(2) 生理生化特征

参考《伯杰氏细菌鉴定手册》^[10]的方法, 对菌株 Y 进行各项生理生化指标试验。

(3) 16S rRNA 基因分子鉴定

将装有解磷菌的平板送至武汉擎科创新生物科技有限公司完成菌种的分子生物学鉴定。

1.2.4 菌株 Y 的植物促生作用分析

(1) 菌株固氮能力的检测

将菌株 Y 划线于 Ashby 固体平板上, 放于 37 °C 培养箱中培养 3 d, 若菌株生长良好, 说明菌株 Y 具有一定的固氮能力; 将菌株 Y 接种于 Ashby 液体培养基中, 放在摇床中 37 °C、200 r/min 培养 7 d, 8 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 对照组为不接种的 Ashby 液体培养基, 采用紫外分光光度法测定上清液中的总氮含量^[11]。

(2) 菌株 Y 产吡啶乙酸能力的检测

配制 100 mg/L L-色氨酸的 Ashby 无氮液体培养基, 接种 1% 菌液, 放在恒温摇床中 37 °C、200 r/min 培养 2 d 后, 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液, 与 Salkowski 比色液等体积混合, 避光静置 30 min 后, 530 nm 处测定吸光度^[12]。空白对照组为未接种的 Ashby 无氮培养基。

(3) 菌肥发酵

分别使用购买的菌糠、蚕蛹和鱼饲料作为菌肥发酵的基质, 按照 1% 的接种量接种菌株 Y

至 500 mL 灭菌后的半固体发酵培养基(基质 30.0 g, 初始水含量为 60%–70%)中, 在 37 °C、200 r/min 的条件下发酵 6 d 即得微生物菌肥^[13]。

(4) 菌肥的含氮量、可溶性磷含量和活菌数检测

取 5 mL 菌肥滤液 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 使用磷钒钼黄比色法测量上清液中的可溶性磷含量, 然后采用平板菌落计数法测量其中的解磷菌数量, 最后采用紫外分光光度法测定上清液中的总氮含量。空白对照组为灭菌后的去离子水组, 结果如表 1 所示。

(5) 盆栽实验

挑选 10 株健康且生长状况相同的朝天椒幼苗, 随机分为 5 组, 每组 2 个平行实验。取武汉科技大学青山校区图书馆后方土壤, 每个花盆中倒土 5 kg, 浇水 500 mL, 用水浸润幼苗根部 30 min 后移栽到花盆中, 室外种植。移栽前测量幼苗的株高、茎直径等参数(叶片面积按照叶片最大长度与宽度积的 0.75 倍计算)。每个花盆中种植 2 株朝天椒幼苗, 在幼苗生长初期不加入肥料, 根据情况适当浇水。30 d 后施加干后的菌糠、鱼饲料和蚕蛹菌肥 2 g, 另一组施加购买的氮磷钾(NPK, 15-15-15)三元复合肥 2 g,

空白对照组为不施加肥料组。培养 60 d 后, 采集朝天椒幼苗测量各项指标。

1.2.5 菌株 Y 生长和解磷条件的单因素试验设计

以 NBRIP 液体培养基为基础培养基, 分别对温度、pH 值、恒温摇床的转速和初始碳源、氮源的种类和浓度进行单因素条件优化, 按 1% 的接种量接种菌液(对照组为不接种的培养基), 每组重复 3 次, 72 h 取样, 采用干重法测定生长量, 使用 pH 计测定菌液的 pH 值, 采用磷钒钼黄比色法计算溶磷量(以 PO_4^{3-} 计, mg/L)和溶磷率, 使用 Origin 绘图。

1.2.6 生长量、pH 值及磷溶出量的变化曲线绘制

设置 3 组平行实验, 取 1 mL 菌液, 分别接入优化前和优化后的 100 mL NBRIP 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 的摇床中培养 2 d, 取样测定干重、pH 值和溶磷量。

1.2.7 菌株 Y 对不同难溶性磷酸盐的溶解实验

取 1 mL 菌液接入含有 2.5 g/L 不同磷酸盐(羟基磷灰石、 CaHPO_4 、磷矿粉、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 FePO_4 和 AlPO_4)的优化后培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养 2 d, 测定干重、pH 值和溶磷量。

表 1 菌肥中氮含量、可溶性磷含量和活菌数

Table 1 Nitrogen content, soluble phosphorus content and viable bacteria number of bacterial fertilizer

组别 Group	总 N 含量 Total N content ($\times 10^2$ mg/L)	可溶性磷含量 Soluble phosphorous content ($\times 10^3$ mg/L)	活菌数 Active bacterium number ($\times 10^8$ CFU/g)
对照组 Control group	0.06 \pm 0.18	0.074 \pm 0.031	—
蚕蛹菌肥 Silkworm pupa bacterial fertilizer	3.41 \pm 0.20	1.105 \pm 0.016	1.17 \pm 0.16
菌糠菌肥 Bacterial bran bacterial fertilizer	3.52 \pm 0.17	1.274 \pm 0.021	1.17 \pm 0.70
鱼饲料菌肥 Fish feed bacterial fertilizer	3.58 \pm 0.14	1.173 \pm 0.014	1.22 \pm 0.71

注: —: 未检测到

Note: —: Not detected.

1.2.8 菌株 Y 解磷的响应面试验设计

使用 Design-Expert 13 分析影响溶磷量的主要因素, 得到适合菌株 Y 解磷的最适培养条件。

1.2.9 菌株 Y 培养液中的有机酸成分分析

将菌株 Y 接种到以 CaHPO_4 为磷源的 NBRIP 液体培养基, 在 $39\text{ }^\circ\text{C}$ 、 180 r/min 恒温摇床中培养 2 d 后, $8\ 000\text{ r/min}$ 离心 15 min 取上清液, $0.45\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤, 装入样品瓶, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存。使用高效液相色谱仪分析有机酸成分, 色谱柱采用 SB-C18 反相柱, 流动相为 2% 甲醇- $0.01\text{ mol/L K}_2\text{HPO}_4$ (调 pH 值至 2.9), 流速 0.5 mL/min , 柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$, 检测波长 215 nm , 进样体积 $5\ \mu\text{L}$ [14]。

2 结果与分析

2.1 解磷菌的筛选

筛选到一株具有解磷能力的菌株 Y, 将菌株 Y 涂布于 NBRIP 固体培养基上, 4 d 后测量菌落和溶磷圈的直径(图 1A), 菌株 Y 的平均溶磷指数 SI 值为 1.799, 说明该菌株解磷能力较强。

表 2 菌株 Y 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain Y

项目 Item	菌株 Y Strain Y	对比菌株(洋葱伯克霍尔德氏菌 ^[15-17]) Reference strain (<i>Burkholderia cepacia</i> ^[15-17])
接触酶 Catalase	+	+
氧化酶 Oxidase	-	N
兼性厌氧 Facultative anaerobic	+	N
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	+	-
淀粉水解 Amylolysis	-	-
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	-
酪素水解 Casein hydrolysis	+	N
油脂水解 Oil hydrolysis	-	+
尿素水解 Urea hydrolysis	+	N
IMVIC 试验		
吲哚试验 Indole test	+	+
IMVIC test		
甲基红试验 Methyl red test	-	-
伏普试验 Voges-Prokauer test	-	-
糖酵解 Glycolysis		
D-葡萄糖 D-glucose	+	+
生长温度 Growth temperature		
$4\text{ }^\circ\text{C}$	+	-
$40\text{ }^\circ\text{C}$	+	+

注: +: 阳性; -: 阴性; N: 不确定

Note: +: Positive; -: Negative; N: Undetermined.

2.2 解磷菌的鉴定

2.2.1 解磷菌的个体形态特征

菌株 Y 在培养基上培养 4 d 后形成乳白色且不透明的菌落, 在 LB 半固体穿刺试验中只生长在穿刺线上, 边缘清晰, 表明菌株 Y 无鞭毛无运动性, 为兼性厌氧菌; 革兰氏染色结果呈阴性, 细胞短杆状、表面光滑且边缘整齐(图 1B)。

2.2.2 菌株 Y 的生理生化特征

根据《伯杰氏细菌鉴定手册》[10]的方法, 菌株 Y 的生理生化特征与伯克霍尔德氏菌属相似(表 2)。

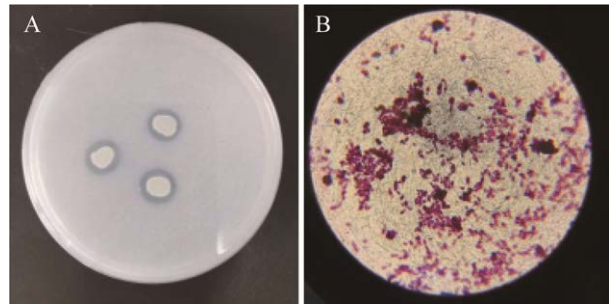


图 1 菌株 Y 的形态特征 A: 菌株 Y 在 NBRIP 固体培养基上的溶磷圈; B: 革兰氏染色显微照片
Figure 1 Morphological characteristics of strain Y. A: Phosphate-solubilizing circle of strain Y on NBRIP solid medium; B: Gram staining micrograph.

2.2.3 菌株 Y 系统发育树的构建

将菌株 Y 送至武汉擎科创新生物科技有限公司完成菌种分子生物学鉴定。获得长为 1 344 bp 的 PCR 产物进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳(图 2), 将此序列上传到 GenBank (登录号为 OL958424), 利用 NCBI 数据库提供的 BLAST 功能进行核苷酸比对, 比对结果显示菌株 Y 与唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)的相似性达到 99.93%, 使用 NCBI 和 MEGA 软件构建系统发育树(图 3), 表明菌株 Y 在系统发育上最接近唐菖蒲伯克霍尔德氏菌。

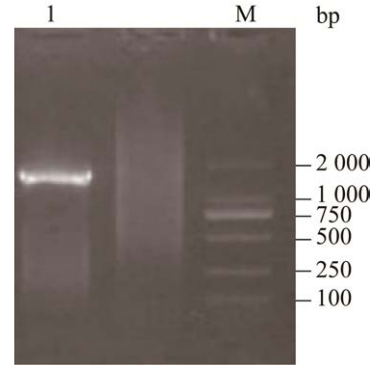


图 2 16S rRNA 基因的 PCR 扩增电泳图
Figure 2 Electrophoretogram of 16S rRNA gene PCR amplification of strain Y. M: DL2000 DNA Marker; 1: Strain Y.

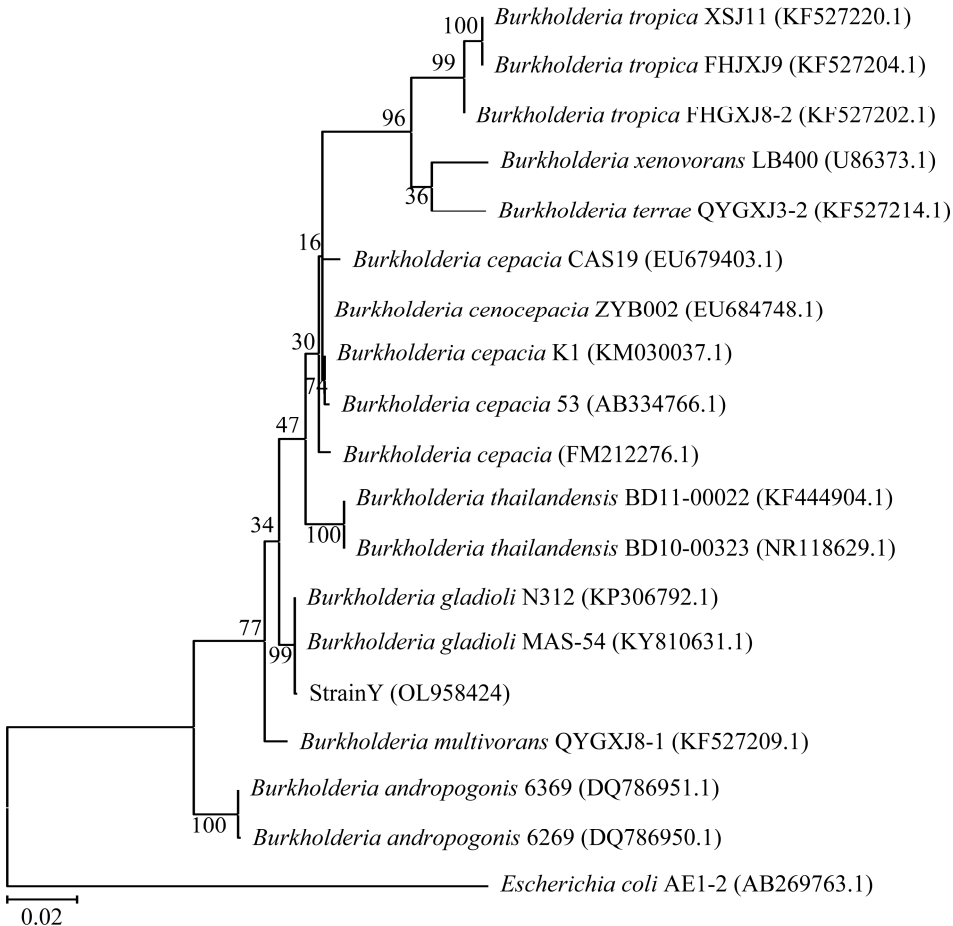


图 3 菌株 Y 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 bootstrap 次数设置为 1 000; 括号内表示 GenBank 登录号; 分支点上的数字表示 bootstrap 的支持率; 左下角标尺表示 2% 的序列进化差异

Figure 3 Phylogenetic tree derived from 16S rRNA gene sequence of strain Y. Bootstrap times are set to 1 000; The numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; The parentheses represent the GenBank login number; Ruler represents 2% of sequence evolutionary differences.

2.3 菌株 Y 的植物促生作用分析

2.3.1 菌株 Y 固氮能力的检测结果

菌株 Y 可以在固体和液体无氮培养基中生长, 通过紫外分光光度法检测得知菌株 Y 的固氮量为 (3.6 ± 1.4) mg/L, 说明菌株有一定的固氮能力。

2.3.2 菌株 Y 产吲哚乙酸能力的检测结果

吲哚乙酸作为一种植物激素, 可以促进植物的生长, 本实验利用分光光度计测得菌株 Y 分泌吲哚乙酸的量为 (9.9 ± 0.6) $\mu\text{g/mL}$, 说明菌株 Y 有一定的产吲哚乙酸能力。

2.3.3 菌肥的含氮量、可溶性磷含量和活菌数检测结果

本实验筛选分离的菌株 Y 通过检测也可以固氮, 固氮量最高可以达到 (3.58 ± 0.14) g/L。如表 1 所示, 通过磷钒钼黄比色法测定清液中的有效磷含量最高为 (1.274 ± 0.021) g/L, 说明施加了菌肥后土壤有效磷含量增加, 证明菌株 Y 有促进植物生长的能力。

2.3.4 盆栽实验结果

与对照组相比, 蚕蛹菌肥、菌糠菌肥、鱼

饲料菌肥和复合肥都能明显地促进朝天椒幼苗的生长(表 3), 其中鱼饲料菌肥促进效果最好, 60 d 后叶片数目和干重的平均变化值分别增大了 152.0%和 166.3%, 表明鱼饲料菌肥对朝天椒幼苗有一定的促生长作用。

2.4 菌株 Y 生长及解磷条件的单因素优化

如图 4 所示, 为了找到菌株生长和解磷的最适碳氮源, 分别测定了 9 种碳源和 5 种氮源, 结果表明, 最适氮源为 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 最适碳源为 20.0 g/L 葡萄糖。在不同的温度、pH 值和转速下测定菌株的生长和溶磷变化, 得到最适温度 37 $^{\circ}\text{C}$, 最适初始 pH 值为 6.0, 摇床转速为 180 r/min。

2.5 生长量和溶磷量的变化曲线绘制结果

条件优化前后菌株生长、pH 值和溶磷量变化结果如图 5 所示, 0–24 h 为延滞期、24–72 h 为对数生长期、72–120 h 为稳定生长期。优化后溶磷量为 158 mg/L、干重为 0.0134 g/mL, 与优化前相比分别增加 15.3%和 12.6%, pH 值在优化前后变化不大。

表 3 施加不同肥料的辣椒苗盆栽实验数据

Table 3 Pot experiments data of pepper seedlings with different fertilizers

组别	叶片数	株高	叶片最大面积	茎直径	根长	干重
Group	Leaves number	Plant height (cm)	Maximum blade area (mm^2)	Stem diameter (mm)	Root length (mm)	Dry weight (g)
对照组	25	36.8	2 872.8	2.3	161.9	24.4
Control group						
复合肥	41	21.5	5 036.8	3.6	143.1	58.0
Compound fertilizer						
蚕蛹菌肥	45	30.3	2 549.3	2.3	221.9	32.7
Silkworm pupa bacterial fertilizer						
菌糠菌肥	53	25.8	1 887.4	3.6	280.4	49.2
Bacterial bran bacterial fertilizer						
鱼饲料菌肥	63	50.0	4 370.0	3.3	183.2	65.0
Fish feed bacterial fertilizer						

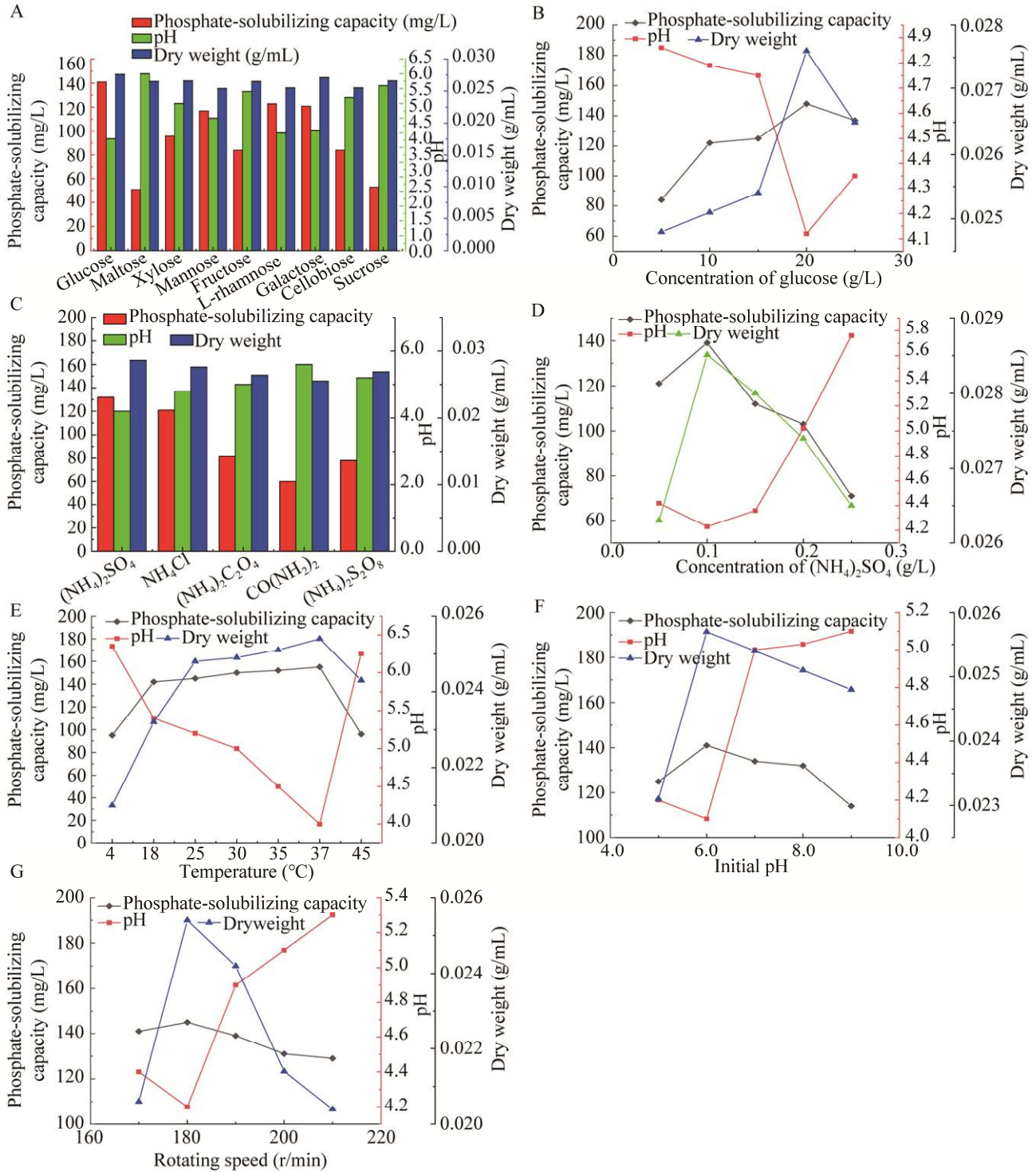


图4 菌株Y生长及解磷条件的单因素试验 A: 碳源种类; B: 葡萄糖浓度; C: 氮源种类; D: 硫酸铵浓度; E: 温度; F: 初始pH值; G: 恒温摇床转速

Figure 4 Single-factor optimization results of growth and phosphorous-solubilizing conditions of strain Y. A: Carbon source; B: Glucose concentration; C: Nitrogen source; D: (NH₄)₂SO₄ concentration; E: Temperature; F: Initial pH; G: Rotating speed.

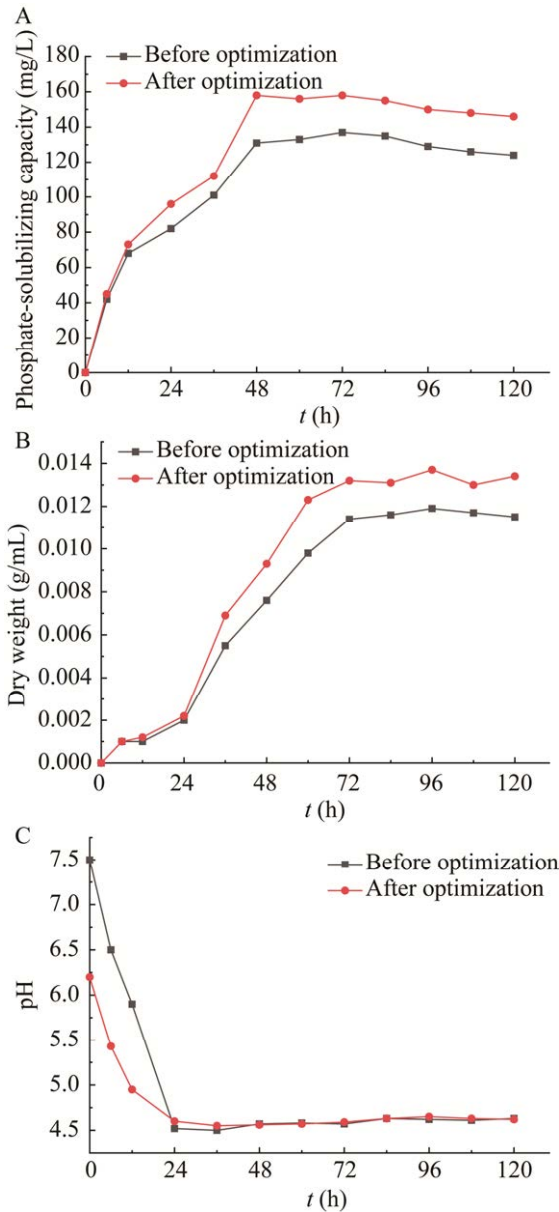


图 5 优化前后菌株 Y 的溶磷量(A)、生长量(B)和 pH (C)变化曲线

Figure 5 Variations curves of phosphate-solubilizing capacity (A), growth (B) and pH (C) of strain Y before and after optimization.

2.6 条件优化后菌株的生长和解磷情况

土壤中的磷元素会与 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Al^{3+} 等离子形成磷酸铁、磷酸钙和磷酸铝等难溶性磷酸盐, 不同土壤中磷酸盐的种类不同。酸性土壤中的解磷微生物主要以 FePO_4 和 AlPO_4 为磷源,

而碱性土壤中的微生物主要以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 和 CaHPO_4 为磷源^[18]。

如图 6 所示, 本实验菌株在不同磷源培养基中的解磷特性存在差异, 解磷能力依次为: CaHPO_4 (1 471.16 mg/L)>磷矿粉(446.62 mg/L)>羟基磷灰石(440.49 mg/L)> $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (158.28 mg/L)> FePO_4 (133.74 mg/L)> AlPO_4 (84.66 mg/L)。菌株 Y 对 CaHPO_4 的解磷效果优于 FePO_4 和 AlPO_4 , 表明其更适合施加到偏碱性土壤中。

2.7 菌株 Y 解磷条件的响应面试验结果

选取单因素试验中影响较大的 4 个因素: 温度 34–40 °C、初始 pH 4.0–8.0、葡萄糖浓度 15–25 g/L 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度 0.05–0.15 g/L, 使用 CaHPO_4 为磷源, 采用 Design-Expert 13 进行响应面优化试验设计^[19], 进行方差分析导出结果(表 4), 得到溶磷量 $PSC=1587.6-17A+2.92B+42.83C-39.75D-8.5AB-21AC+AD+37.75BC+51.5BD+18.75CD-92.13A^2-64.26B^2+6.37C^2-46.01D^2$ 的回归方程。从表 4 可以看出, F 值为 10.89, $P<0.0001$, 达到极显著水平, 失拟项 $P=0.1406$,

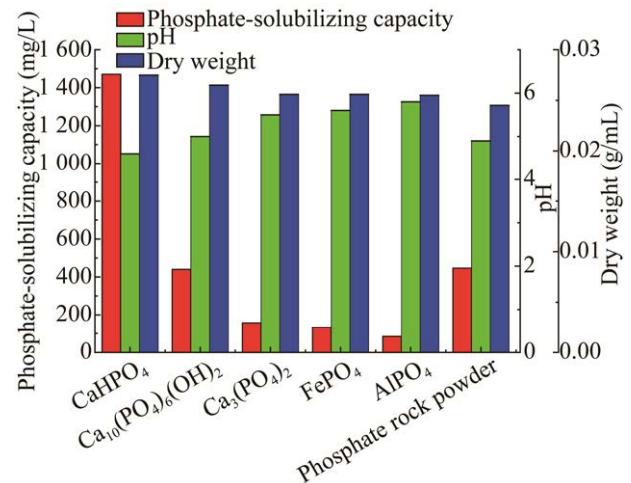


图 6 不同磷源培养基中菌株 Y 的生长、溶磷量和 pH 变化

Figure 6 Test results of growth, phosphate-solubilizing capacity and pH by strain Y in different phosphorus source media.

差异不显著,说明该模型拟合情况好、试验误差小,表明该模型可用于溶磷量的测定。 C 、 D 、 BD 、 A^2 、 B^2 和 D^2 均为差异极显著($P<0.01$), BC 均为差异显著($P<0.05$) (图 7),其余项差异不显著。根据 F 值大小,可以得出试验各因素对溶磷量影响的顺序为: C (葡萄糖浓度) $>D$ (硫酸铵浓度) $>A$ (温度) $>B$ (初始 pH 值)。运用 Design-

Expert 14 软件分析得知菌株 Y 的最适液体培养基为: 温度 39.9 °C、初始 pH 6.2、葡萄糖浓度 23.1 g/L 和硫酸铵浓度 0.066 g/L, 预测值为 1 495.22 mg/L, 在该条件下进行了 3 次平行试验, 试验结果分别为 1 497.31、1 491.56 和 1 496.43 mg/L, 平均值为 1 495.10 mg/L, 与预测值相近, 表明优化结果可靠。

表 4 回归模型的方差分析

Table 4 Analysis of variance for regression model

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
Source	Sum of squares	df	Mean Square	F -value	P -value
Model	1.45E+05	14	10 386.83	10.89	<0.000 1
A 温度	3 468	1	3 468.00	3.64	0.77
A Temperature					
B 初始 pH 值	102.08	1	102.08	0.107 1	0.748 3
B Initial pH					
C 葡萄糖浓度	22 016.33	1	22 016.33	23.09	0.000 3
C Glucose concentration					
D 硫酸铵浓度	18 960.75	1	18 960.75	19.89	0.000 5
D Ammonium sulfate concentration					
AB	289	1	289.00	0.303 1	0.590 6
AC	1 764	1	1 764.00	1.85	0.195 3
AD	4	1	4.00	0.004 2	0.949 3
BC	5 700.25	1	5 700.25	5.98	0.028 3
BD	10 609	1	10 609.00	11.13	0.004 9
CD	1 406.25	1	1 406.25	1.47	0.244 6
A^2	55 060.87	1	55 060.87	57.75	<0.000 1
B^2	26 783.57	1	26 783.57	28.09	0.000 1
C^2	262.93	1	262.93	0.275 8	0.607 7
D^2	13 730.38	1	13 730.38	14.4	0.002
残差	13 347.62	14	953.40		
Residual					
失拟项	11 840.42	10	1 184.04	3.14	0.140 6
Lack of Fit					
纯误差	1 507.2	4	376.80		
Pure Error					
总离差	1.59E+05	28			
Cor Total					

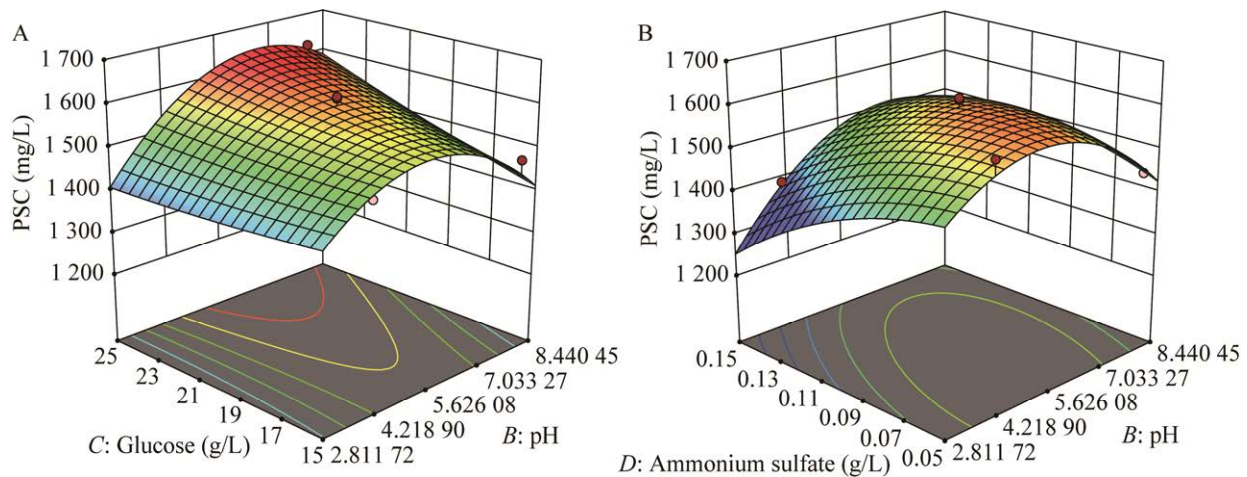


图7 BC、BD 因素之间对溶磷量影响的响应图

Figure 7 Curves of response between BC, BD factors affecting phosphate-solubilizing capacity.

2.8 菌株 Y 对难溶性磷酸盐的溶出液中有有机酸分析

图8显示菌株Y解磷机理与其分泌的有机酸有关,降低环境中的pH值,使得 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、 FePO_4 和 AlPO_4 溶解,释放出磷酸根离子,通过高效液相色谱仪分析出菌株Y分泌的有机酸成分见表5。当磷酸三钙为磷源时,菌株产葡萄糖醛酸6.14 mg/L、酒石酸4.09 mg/L;当磷酸氢钙为磷源时,产葡萄糖醛酸1.35 mg/L、D-L-苹果酸1.18 mg/L;当磷矿粉为磷源时,产葡萄糖醛酸14.03 mg/L、D-L-苹果酸2.84 mg/L、乙酸1.29 mg/L,这些有机酸导致菌液的pH改变。

2.9 外源物质对菌株 Y 生长和解磷效果的影响

在优化后的培养基中添加20种氨基酸和甲酸钠,如图9所示,20种氨基酸中L-谷氨酰胺和甘氨酸对菌株的生长和解磷有一定的抑制作用,其余18种氨基酸均有一定程度上的促进作用,其中D-蛋氨酸的促进作用最明显;添加浓度为0.04 g/L的D-蛋氨酸后,菌株对磷酸氢钙的溶磷量为1682 mg/L,对生长量和溶磷量的促进效果达到19.09%和16.16%,菌液pH值降低;甲酸钠对菌株的生长和溶磷有抑制效果,浓度为

50 g/L时的抑制效果最明显。

2.10 外源物质对菌株解磷影响的机理探究结果

将D-蛋氨酸和甲酸钠添加到100 mL优化后的NBRIP液体培养基中(对照组为不添加外源物质组),培养2 d后,取5 mL菌液于10 000 r/min离心8 min,取上清液做高效液相色谱(图10)。

如表6所示,添加D-蛋氨酸后菌液中的葡萄糖醛酸含量减少29.4%,D-L-苹果酸含量增加358.7%,而添加甲酸钠之后,葡萄糖醛酸和D-L-苹果酸含量分别降低56.6%和75.0%,表明D-蛋氨酸主要通过促进D-L-苹果酸的含量来促进菌株Y的解磷效果,而甲酸钠则通过减少葡萄糖醛酸和D-L-苹果酸的含量来抑制菌株Y的解磷效果。

3 讨论与结论

目前,为了解决土壤有效磷含量不足的问题,人们大多采用施加磷肥的方法,但所带来的环境污染、效率低的问题依然突出,因此,研究细菌解磷的机理和应用具有重要意义^[20]。邢芳芳等^[21]从大麦根际土壤中筛选出一株具有高效溶磷能力的枯草芽孢杆菌,在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源的培养基中培养6 d,可溶性磷含量

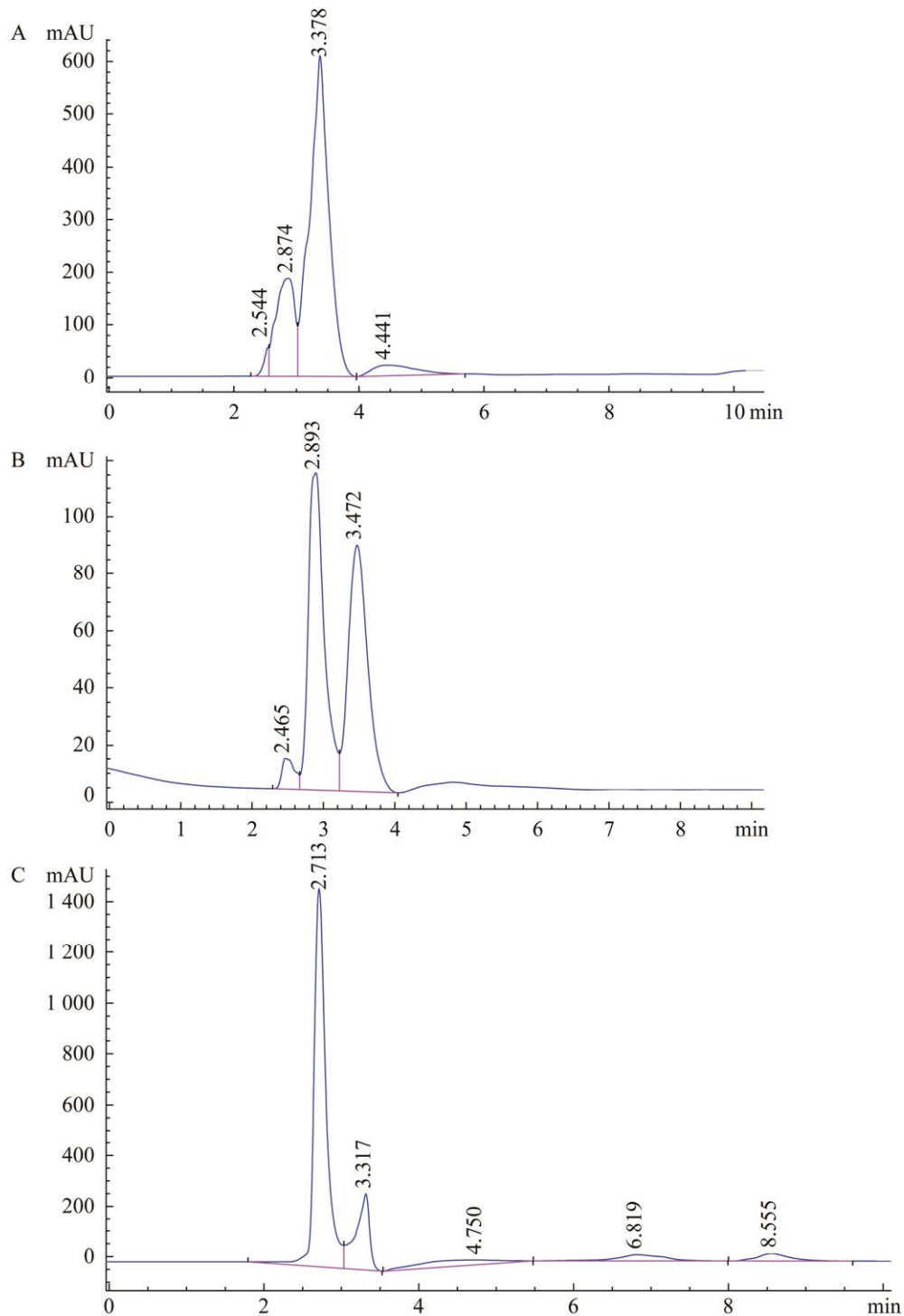


图 8 菌株 Y 对不同磷酸盐溶出液中有机酸的高效液相色谱图 A: 磷酸三钙 B: 磷酸氢钙 C: 磷矿粉

Figure 8 HPLC analyses of organic acids in the cultures of strain Y with different insoluble phosphates. A: $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; B: CaHPO_4 ; C: Phosphate rock powder.

表 5 菌株 Y 对不同难溶性磷酸盐的溶出液中的有机酸浓度

Table 5 Concentrations of organic acids in the cultures of strain Y with different insoluble phosphates (mg/L)

磷酸盐种类	葡萄糖醛酸	酒石酸	D-L-苹果酸	乙酸
Phosphate species	Glucuronic acid	Tartaric acid	D-L-malic acid	Acetic acid
Ca ₃ (PO ₄) ₂	6.14	4.09	—	—
CaHPO ₄	1.35	—	1.18	—
磷矿粉 Phosphate rock powder	14.03	—	2.84	1.29

Note: —: No data.

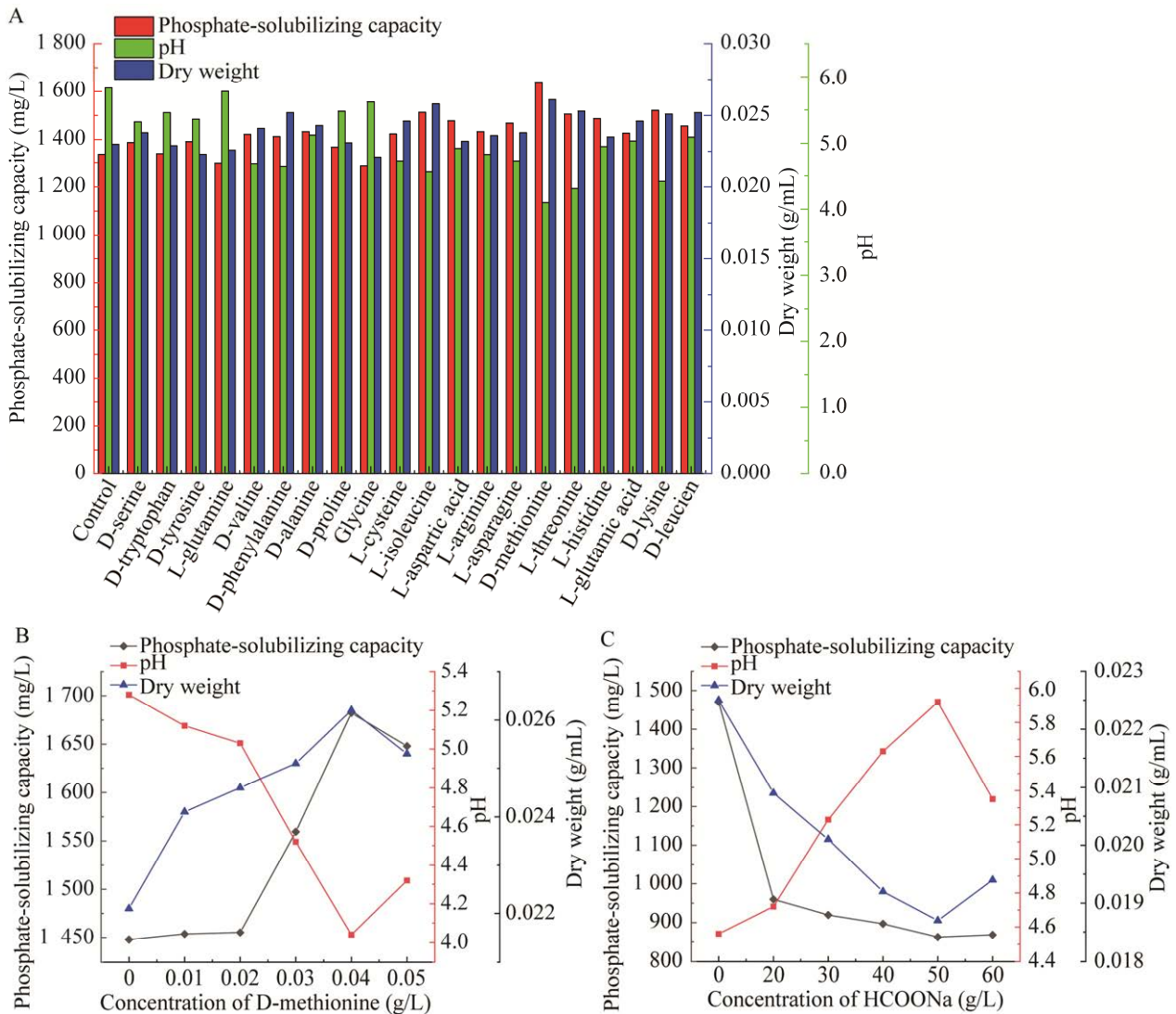


图 9 不同外源物质对菌株 Y 生长、溶磷和 pH 的影响 A: 不同氨基酸下的溶磷量、pH 值和干重; B: D-蛋氨酸浓度; C: 甲酸钠浓度

Figure 9 Effects of different exogenous substances on growth, phosphate-solubilizing capacity and pH of strain Y. A: Phosphate-solubilizing capacity, pH and dry weight with different amino acids; B: D-methionine concentration; C: HCOONa concentration.

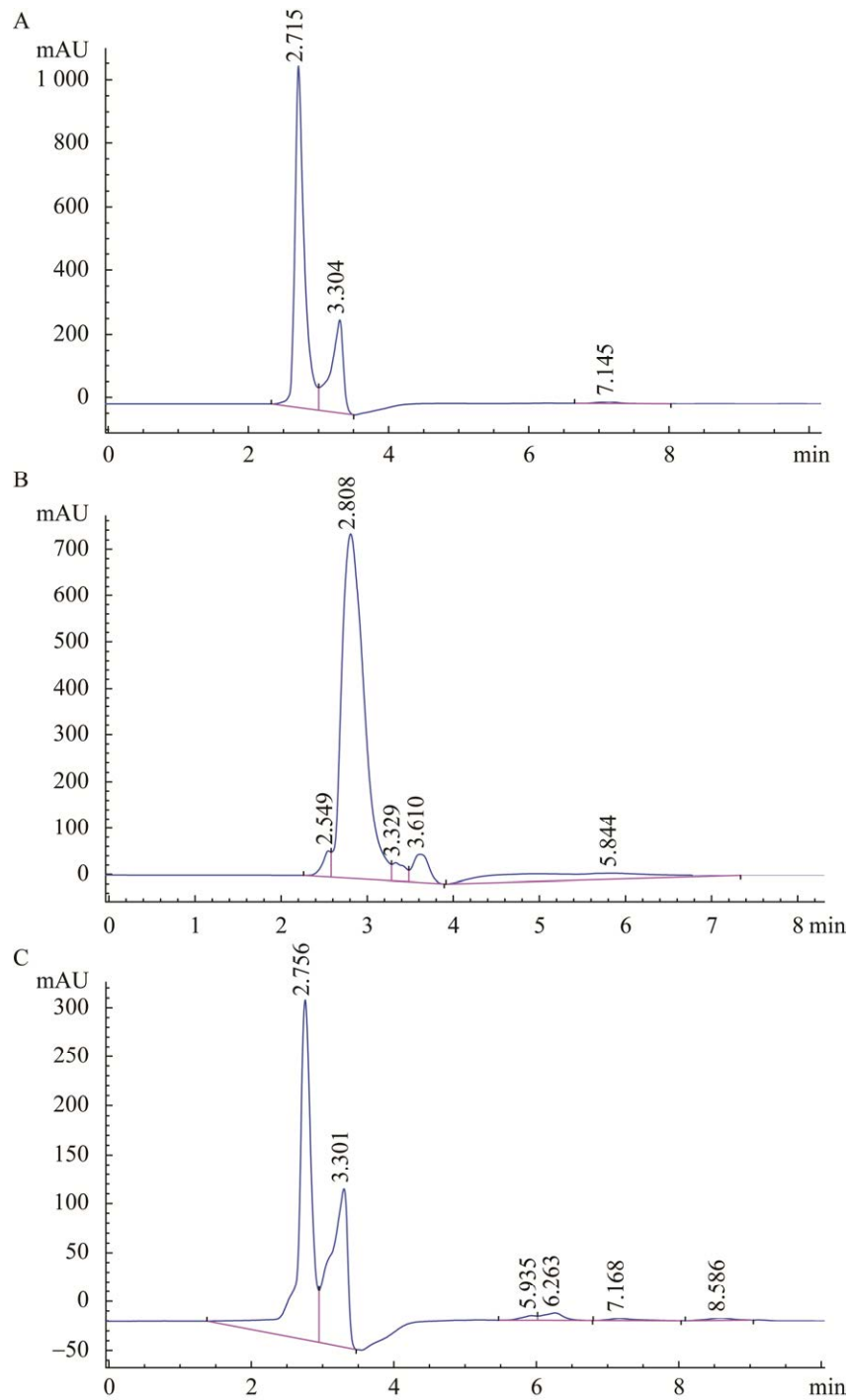


图 10 添加不同外源物质后菌株 Y 产有机酸的高效液相色谱图 A: 对照组; B: D-蛋氨酸; C: 甲酸钠

Figure 10 High performance liquid chromatography of organic acids produced by strain Y after adding different exogenous substances. A: Control group; B: D-methionine group; C: Sodium formate group.

表 6 菌株 Y 对 CaHPO_4 溶出液中的有机酸浓度(mg/L)Table 6 Concentrations of organic acids in the cultures of strain Y with CaHPO_4 (mg/L)

有机酸	出峰时间	对照组	D-蛋氨酸组	甲酸钠组
Organic acids	Peak time	Control group	D-methionine group	Sodium formate group
葡萄糖醛酸	2.7	8.70	6.14	3.77
Glucuronic acid				
D-L-苹果酸	3.6	2.79	12.80	2.04
D-L-malic acid				

达到 220.85 mg/L。吕俊等^[22]从马尾松根际土中分离出一株高效溶磷的伯克霍尔德里氏菌, 在以 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为唯一磷源时溶磷量最大为 220.85 mg/L。本实验从武汉科技大学图书馆后空地土壤中筛选出一株高效解磷菌, 经鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德里氏菌。

研究表明, 解磷菌可以通过分泌有机酸、质子、铁载体等物质或者胞外酶两种途径来溶解环境中的无机磷, 因此, 研究菌株的解磷机理并促进其解磷能力十分重要^[15]。林启美等^[23]报道 4 株溶磷细菌和真菌在生长繁殖过程中能够产生有机酸和质子, 将菌液的 pH 值维持在 3.0 左右, 破坏磷矿粉的结构。张银翠等^[24]报道解磷菌的溶磷除了与培养液 pH 值降低有关外, 还与菌株分泌的有机酸种类有关, 种类越多溶磷效果越好。本研究发现菌株 Y 能够分泌葡萄糖醛酸等多种有机酸, 并降低培养液的 pH 值, 这与林启美等、张银翠等的研究结果一致。

研究发现很多细菌可以合成分泌氨基酸作为信号分子调节细胞群体行为, 从而提高其对环境的适应能力。D-氨基酸是细菌细胞壁中短肽的组成部分, 能够影响细菌产生孢子, 作为细菌生长的影响成分^[25]; L-氨基酸是蛋白质的重要组成部分, 在生物体的生命活动中起到十分重要的作用。甲酸钠具有抗氧化作用, 能够抑制氧自由基对生物体的损伤作用^[26], 因此将 20 种氨基酸和甲酸钠作为外源物质添加到菌株解磷的环境中, 期望提升菌株的解磷能力。本

研究得到的结论如下:

(1) 从武汉科技大学图书馆后空地土壤中分离得到一株具有解磷能力的唐菖蒲伯克氏菌 (*Burkholderia gladioli*)。

(2) 最适合菌株生长和解磷的条件为: 温度 39.9 °C、初始 pH 6.2、摇床转速 180 r/min、葡萄糖 23.1 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.066 g/L、磷源 CaHPO_4 0.5 g/L。

(3) 菌株的溶磷率与菌株分泌有机酸浓度呈正相关性, 菌株 Y 主要分泌葡萄糖醛酸和 D-L-苹果酸来溶解有机酸。

(4) 0.04 g/L 的 D-蛋氨酸对菌株生长和解磷有促进作用, 主要通过促进 D-L-苹果酸的含量来促进菌株 Y 的解磷效果, 对生长量和溶磷量的促进效果达到 19.09% 和 16.16%。50 g/L 甲酸钠对菌株生长有抑制作用, 通过减少葡萄糖醛酸和 D-L-苹果酸的含量来抑制菌株 Y 的解磷效果, 抑制效果达到 39.08% 和 10.66%。

REFERENCES

- [1] 李宁, 王珊珊, 马丽丽, 刘耀辉, 修玉冰, 李新华, 项国栋, 胡冬南, 郭晓敏, 张文元. 两株高效溶磷菌的溶磷能力及其对玉米生长和红壤磷素形态的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(2): 275-283
Li N, Wang SS, Ma LL, Liu YH, Xiu YB, Li XH, Xiang GD, Hu DN, Guo XM, Zhang WY. Phosphate-solubilizing capacity of two bacteria strains and its effect on maize growth and the phosphorus fractions in red soil[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizers, 2021, 27(2): 275-283 (in Chinese)
- [2] 孟建宇, 高风芝, 佟昕, 郭慧琴. 以纤维素为载体的混合微生物菌肥对玉米的促生作用[J]. 中国饲料,

- 2021(23): 93-96
Meng JY, Gao FZ, Tong X, Guo HQ. Effects of mixed microbial fertilizer with cellulose as carrier on growth promotion of maize[J]. China Feed, 2021(23): 93-96 (in Chinese)
- [3] 万朕, 李莉, 郑裴, 方尚玲, 张晶, 陈茂彬. 一株产丁酸菌的分离、纯化及产酸研究[J]. 酿酒, 2011, 38(1): 26-29
Wan Z, Li L, Zheng P, Fang SL, Zhang J, Chen MB. Study on isolation & purification and acid-production of butyric acid bacteria[J]. Liquor Making, 2011, 38(1): 26-29 (in Chinese)
- [4] 杨雪, 谢永丽, 陈兰, 吴晓晖, 武玲玲, 孟晓霞, 夏介卓玛. 青海极端生境 7 株萎缩芽孢杆菌的生物活性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版) 2020, 49(4): 459-466
Yang X, Xie YL, Chen L, Wu XH, Wu LL, Meng XX, Xia J. Biological activity of 7 *Bacillus atrophaeus* strains isolated under extreme environment in Qinghai[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2020, 49(4): 459-466 (in Chinese)
- [5] 汪钱龙, 张德智, 王菊芬, 邓必强, 周丽洪, 魏兰芳. 不同植物促生细菌对玉米生长的影响及其生长素分泌能力研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2015, 30(4): 494-498
Wang QL, Zhang DZ, Wang JF, Deng BQ, Zhou LH, Wei LF. Effects of plant growth-promoting bacterial on the growth of maize and the IAA secrete ability detection[J]. Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science, 2015, 30(4): 494-498 (in Chinese)
- [6] 郑丽霞, 王玉书, 刘海, 黄建国. 吡虫啉对伯克霍尔德氏菌生长和溶磷作用的影响[J]. 土壤学报, 2020, 57(1): 174-182
Zheng LX, Wang YS, Liu H, Huang JG. Effects of imidacloprid on the growth and P-solubilization of *Burkholderia yabunchi*[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(1): 174-182 (in Chinese)
- [7] 赵咏梅, 李婷雨, 阮倩. 土壤解磷菌 RQ3-01 的筛选及初步鉴定[J]. 陕西农业科学, 2021, 67(4): 19-21, 34
Zhao YM, Li TY, Ruan Q. Screening and preliminary identification of phosphate solubilizing bacteria RQ3-01 in soil[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2021, 67(4): 19-21, 34 (in Chinese)
- [8] 瞿筱菁, 唐国平. 磷钼钒黄比色法测定循环水中磷酸盐的探讨[J]. 大氮肥, 2001, 24(5): 351-354
Qu YQ, Tang GP. Discussions on the detection of phosphate in recycling water using phosphorus vanadium molybdate yellow colorimetric method[J]. Large Scale Nitrogenous Fertilizer Industry, 2001, 24(5): 351-354 (in Chinese)
- [9] 崔晓羽, 汪桂玲, 朱若林. 中华草龟荧光假单胞菌的分子鉴定及分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(6): 2552-2558
Cui XY, Wang GL, Zhu RL. Molecular identification and analysis of *Pseudomonas fluorescens* in chinemys reevesii[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(6): 2552-2558 (in Chinese)
- [10] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰氏细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
- [11] 裴豹. 多种解磷、解钾、固氮菌混合发酵制备菌糠菌肥的研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2014
Chang B. Producing biofertilizer with spent mushroom substrate using co-inoculation of various of phosphate-solubilizing, potassium solubilizing and nitrogen fixing bacteria[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2014 (in Chinese)
- [12] 贾西贝, 王琦琦, 李杨, 褚贵新, 孙燕飞. 一株产吡啶乙酸耐盐促生菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国酿造, 2019, 38(11): 37-42
Jia XB, Wang QQ, Li Y, Zhu GX, Sun YF. Isolation, identification and fermentation conditions optimization of a salt-tolerant, growth-promoting and indoleacetic acid-producing bacterium[J]. China Brewing, 2019, 38(11): 37-42(in Chinese)
- [13] 谷东杰, 刘倩. 碱性过硫酸钾消解紫外分光光度法测定水中总氮[J]. 山东化工, 2020, 49(11): 103-105
Gu DJ, Liu Q. Determination of total nitrogen in water quality by ultraviolet spectrophotometry with potassium persulfate digestion[J]. Shandong Chemical Industry, 2020, 49(11): 103-105 (in Chinese)
- [14] 黎东, 陈仕伟, 李小川, 张福. 高效液相色谱(HPLC)分析方法同时测定山楂果醋中七种有机酸[J]. 现代食品, 2019(10): 176-180, 186
Li D, Chen SW, Li XC, Zhang F. Determination of seven organic acids in hawthorn vinegar by HPLC[J]. Modern Food, 2019(10): 176-180, 186 (in Chinese)
- [15] 邵闯. 一株高效溶磷的多功能菌株的筛选鉴定及其应用研究[D]. 武汉: 湖北大学硕士学位论文, 2018
Shao C. Screening, identification and application of a highly efficient phosphorus dissolving multifunctional bacteria[D]. Wuhan: Master's Thesis of Hubei

- University, 2018 (in Chinese)
- [16] 朱德旋, 杜春梅, 董锡文, 薛春梅, 王瑞. 一株寒地高效解无机磷细菌的分离鉴定及拮抗作用[J]. 微生物学报, 2020, 60(8): 1672-1682
Zhu DX, Du CM, Dong XW, Xue CM, Wang R. Identification and antagonism activity of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain isolated from cold region[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(8): 1672-1682 (in Chinese)
- [17] 史国英, 莫燕梅, 岑贞陆, 曾泉, 余功明, 杨丽涛, 胡春锦. 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
Shi GY, Mo YM, Cen ZL, Zeng Q, Yu GM, Yang LT, Hu CJ. 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)
- [18] Bashan Y, Kamnev A. A., De-Bashan L. E.. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth[J]. Biology and fertility of soils, 2013, 49(1):1-2
- [19] 史军花, 许向华, 赵国罡, 郑鸿雁. 响应面法优化 *Bacillus subtilis* XH-13_UV3-8 产葡萄糖-1-磷酸的发酵条件[J]. 食品工业科技, 2011, 32(8): 176-179, 184
Shi JH, Xu XH, Zhao GG, Zheng HY. Optimization of fermentation condition of Glucose-1-phosphate production by *Bacillus subtilis* XH-13_UV3-8 with response surface methodology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(8): 176-179, 184 (in Chinese)
- [20] 李东坡, 武志杰. 化学肥料的土壤生态环境效应[J]. 应用生态学报, 2008, 19(5): 1158-1165
Li DP, Wu ZJ. Impact of chemical fertilizers application on soil ecological environment[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2008, 19(5): 1158-1165 (in Chinese)
- [21] 邢芳芳, 高明夫, 嵯优优, 胡兆平, 李新柱. 大麦根际高效溶磷菌的筛选、鉴定及促生效果研究[J]. 华北农学报, 2016, 31(S1): 252-257
Xing FF, Gao MF, Zhuo YY, Hu ZP, Li XZ. Screening and identification of phosphate solubilizing bacteria in *Hordeum vulgare* rhizosphere and its growth promoting effect[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 31(S1): 252-257 (in Chinese)
- [22] 吕俊, 于存. 一株高效溶磷伯克霍尔德菌的筛选鉴定及对马尾松幼苗的促生作用[J]. 应用生态学报, 2020, 31(9): 2923-2934
Lyu J, Yu C. Screening and identification of an efficient phosphate-solubilizing *Burkholderia* sp. and its growth-promoting effect on *Pinus massoniana* seedling[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2020, 31(9): 2923-2934 (in Chinese)
- [23] 林启美, 赵海英, 赵小蓉. 4 株溶磷细菌和真菌溶解磷矿粉的特性[J]. 微生物学通报, 2002, 29(6): 24-28
Lin QM, Zhao HY, Zhao XR. The characteristics of solubilizing rock phosphate by four isolates of bacteria and fungi[J]. Microbiology China, 2002, 29(6): 24-28 (in Chinese)
- [24] 张银翠, 姚拓. 溶磷细菌的溶磷及分泌吲哚乙酸能力研究[J]. 草原与草坪, 2020, 40(2): 17-22
Zhang YC, Yao T. Study on the abilities of phosphorus solubilizing and indoleacetic acid secretion of phosphorus solubilizing bacteria[J]. Grassland and Turf, 2020, 40(2): 17-22 (in Chinese)
- [25] 邢苏芳. D-氨基酸对生物膜形成过程的调控机理研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2014
Xing SF. Regulation mechanism research for the effect of D-amino acids on biofilm formation processes[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2014 (in Chinese)
- [26] 蒋建伟, 何文珊, 李琳, 严玉霞. 甲酸钠的抗氧化作用[J]. 华南理工大学学报(自然科学版), 1999, 27(7): 56-60
Jiang JW, He WS, Li L, Yan YX. A study on antioxidation effect of formate sodium[J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science, 1999, 27(7): 56-60 (in Chinese)