

一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性

刘文干^{1,2}, 何园球², 张坤¹, 樊建波², 曹慧^{1*}

¹南京农业大学农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

²中国科学院南京土壤研究所, 南京 210008

摘要:【目的】为了提高红壤磷素利用率, 探讨溶磷菌溶磷机理。【方法】利用难溶性无机盐培养基从花生根际土壤样品中分离到一株溶磷菌 C5-A, 结合菌落形态特征、生理生化和 16S rRNA 序列确定该菌株的系统发育地位; 通过菌株 C5-A 在 NBRIP 液体培养基培养过程中培养液 pH 变化确定其溶磷能力; 利用液体发酵实验测定不同的碳源、氮源对菌株 C5-A 溶磷的影响; 通过高效液相色谱检测 C5-A 在不同氮源培养液中有机酸的种类和浓度。【结果】菌株 C5-A 鉴定为洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*), 遗传稳定性较好。在 FePO_4 和 AlPO_4 培养液中, 菌株 C5-A 的溶磷量和 pH 变化呈显著负相关; 菌株 C5-A 对磷酸三钙、磷酸铝、磷酸铁、磷矿粉均有较强的溶解能力, 最高溶磷量分别为 125.79、227.34、60.02 和 321.15 mg/L; 菌株 C5-A 对不同浓度的两种磷矿粉有较强的溶解能力; 分别以麦芽糖和草酸铵为碳源和氮源时溶磷量最高。高效液相色谱检测出 10 种有机酸, 分别为草酸(葡萄糖酸)、乙酸、苹果酸、琥珀酸和 5 种未知有机酸, 然而, 乙酸而非草酸似乎是影响 C5-A 溶磷的重要有机酸。【结论】从红壤花生根际土壤中筛选到一株对难溶性无机盐具有较强溶解能力溶的菌株 C5-A, 有望为开发高效红壤微生物磷肥提供种质资源。

关键词: 溶磷菌, 溶磷量, 鉴定, 有机酸, 碳源, 氮源, pH

中图分类号: S154.39 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 03-0326-08

磷是促进作物生长和提高农业产量不可缺少的元素之一^[1], 然而, 由于磷元素在土壤中通常是以难溶的金属螯合物形式存在导致绝大多数土壤中有有效磷缺乏^[2], 为了提高农业产量, 大量磷肥被施入土壤中, 其中用于作物吸收的仅占很少一部分, 绝大多数磷迅速转化为难溶形态如 Al-P 和 Fe-P 存在于土壤中^[3-4], 或是雨水被冲洗流入净水和表层水体中造成水体污染^[5], 因此, 通过生物学的方法寻求高效微生物磷肥迫在眉睫。

作物根际存土壤存在大量的溶磷菌, 能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用形态, 某些

溶磷菌如青霉菌^[6]、阴沟肠杆菌、枯草芽胞杆菌^[7]、粘质沙雷氏菌 EB 67 和假单胞菌 CDB 35^[8] 以及假单胞菌 BR2^[9] 和磷矿粉肥混合使用时能够促进植物生长, 部分溶磷菌还能有效抑制作物病原菌, 增强作物抗病力^[1,10]。

产生低分子量有机酸被认为是溶磷菌的主要溶磷机制^[11-13], 有机酸通过羟基或羧基与难溶性磷酸盐上的金属离子螯合从而转化成可溶性形态^[14], 不同碳源和氮源对微生物产生有机酸的种类和浓度有很大影响, 某些溶磷菌接种到作物根际未能促进作物生长可能是由于溶磷菌的溶磷活性受到土壤中碳

基金项目: 国家科技支撑项目(2009BAD6B04, 2009BAD6B003-3, 2011BAD31B04); 国家自然科学基金(40871125, 30971869)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-25-84396753; E-mail: hcao@njau.edu.cn

作者简介: 刘文干(1987-), 男, 安徽合肥人, 硕士研究生, 研究方向为微生物分子生态学。E-mail: ganwenliu@163.com

收稿日期: 2011-08-20; 修回日期: 2011-12-13

氮源的限制。

红壤是我国南方典型土壤类型,占全国面积的11.8%。由于其特殊的成土过程,土壤中粘粒和氧化铁、铝含量均较高加之大量磷肥长期不合理施用以及土壤“酸”、“瘦”、“板”、“结”的自然特点使土壤磷素水平及有效性较低,制约着该地区作物产量的提高。其特殊性质可能会导致非土著溶磷菌定制能力差、溶磷能力退化快、菌种淘汰率高等劣势。本研究以红壤旱地长期定位施肥实验为依托,通过对花生根际溶磷菌的分离、鉴定并对筛选到的高效溶磷菌株进行溶磷能力的测定、培养条件的优化和发酵液中有机的分析,可能为探讨溶磷菌溶磷机理,提高红壤磷素利用率,丰富溶磷菌菌种资源提供生物学支持。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 小区概况:本实验选择中国科学院江西红壤生态实验站的长期试验土壤(该试验始于1988年)进行研究,小区设计参照文献[15]。

1.1.2 供试土壤:供试土壤为第四纪红色粘土发育的旱地红壤,2010年8月收获花生时采样,每个小区采用五点采样法采集花生根际土壤,充分混合后分成3份:一份4℃保存,一份-20℃保存,一份土样风干后过2 mm筛备用。

1.1.3 培养基:(1)分离培养基(改良后的PVK^[16]);(2)筛选培养基(NBRIP^[17]);(3)细菌培养基(LB培养基):Trypton 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, pH 7.0, 水1000 mL。固体培养基中加2%琼脂。

1.1.4 供试P源:难溶磷酸盐为磷酸三钙Ca₃(PO₄)₂、磷酸铝AlPO₄,购于天津科密欧试剂公司;磷酸铁FePO₄购于SIGMA试剂公司。云南昆阳磷矿粉:磷矿粉Kunyang Yunnan RP、江西吴村磷矿粉Wucun Jiangxi RP,所有磷矿石粉碎过100目筛。用2%的柠檬酸浸提,钒钼黄法测定磷矿粉有效P含量;用硝酸浸提1:1,钒钼黄法测定磷矿粉全P含量。结果云南昆阳和江西吴村磷矿粉全磷和有效磷分别为34.57%、2.9%、5.06%、1.8%。

1.2 溶磷菌的分离筛选

1.2.1 溶磷菌株初筛:称取1 g土样溶于99 mL无菌水中,用10倍稀释法分别配制10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ g/mL的土壤悬液,分别涂布到分离培养基上,

28℃培养4天,观察出现溶P圈的菌落,测定溶P圈直径(D)、菌落直径(d),根据能否产生溶P圈与D/d值大小来初步确定菌株的溶P能力。将D/d≥1.5的菌株利用平板划线法分离纯化后,4℃下保存于LB斜面培养基,-70℃保存菌种于甘油管中。

1.2.2 摇瓶复筛:250 mL三角瓶中装入液体筛选培养基100 mL,高压灭菌115℃、30 min备用。将在LB液体培养基中摇瓶生长过夜的细菌制成菌悬液,取菌悬液2 mL接种于上述灭菌的液体筛选培养基中,以不接菌为对照,每个处理4次重复,摇床培养28℃,180×g 7天,测定有效P含量和pH值。

1.3 菌株溶磷效果的测定

1.3.1 菌悬液的制备:将PDA培养基上培养48 h的菌刮入无菌水中,于涡旋仪中混合30 s,制成菌悬液,菌数约为1×10⁸ CFU/mL。

1.3.2 菌株对2种难溶性磷酸盐溶解能力测定:三角瓶中装入100 mL已灭菌的筛选培养基,难溶磷酸盐磷酸铝和磷酸铁浓度均为5 g/L,接种量2 mL,28℃,180×g摇床培养,分别于接种后1、3、5、7、9天取发酵液5 mL于12000×g,4℃离心10 min,取上清液测定有效P含量和pH值。设不接菌为对照,每个处理重复3次。

1.3.3 菌株对2种磷矿粉溶解能力的测定:取2 mL菌液接入到100 mL筛选培养基中,供试分别为云南昆阳和江西吴村两种磷矿粉,加入量分别为3 g/L和5 g/L,在28℃、180×g摇床条件下培养9天,测定培养液中有有效P含量。设接不接菌和接菌2种处理,每个处理重复3次。

1.3.4 不同碳、氮源对溶磷菌溶磷量的影响:以(NH₄)₂SO₄为氮源,分别以葡萄糖、蔗糖、淀粉、麦芽糖为碳源,加入量为1% (m/v),进行培养,测定溶磷;确定碳源后,将(NH₄)₂SO₄等当量替换为KNO₃、CO(NH₂)₂、(NH₄)₂C₂O₄·H₂O,测定溶磷量。

1.3.5 有机酸的测定:对不同氮源培养条件下菌株C5-A的发酵产物进行HPLC分析,确定有机酸的种类和浓度。其色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax SB-AQ反相C18柱,流动相:0.1% H₃PO₄的去离子水和乙腈(V/V)98:2;波长:210 nm;流速:0.8 mL/min;进样量:20 μL;柱温:35℃。草酸、乙酸、苹果酸、乳酸、柠檬酸、琥珀酸(均为色谱纯,购于Sigma公司),保留时间分别是4.087、4.322、4.726、5.654、5.972、7.175 min。

1.3.6 测定方法:用pHS-29A型酸度计测定发酵

液的 pH 值;将发酵液 $12000 \times g$ 4°C 离心 10 min,取上清液稀释适当倍数,利用 UV3010 紫外可见分光光度计在 700 nm 处通过钼锑抗比色法测定光密度并计算有效 P 含量,溶 P 量为扣除不接种对照的值;数据采用 SPSS16.0 统计软件和 Excel 进行方差分析,DPS9.5 进行显著性差异分析,LSR 显著性检验和相关性分析。

1.4 溶磷菌株的鉴定

菌株形态及生理生化特性测定参照文献 [18] 进行。菌株 16S rDNA 序列测定,同源性分析参照文献 [19]。采用细菌通用引物 F27 (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') R1492 (5'-TACCTTGTTACGACTT-3') 建立如下的扩增反应体系:50 μL PCR 反应体系:灭菌双蒸水 28.4 μL , $10 \times \text{Ta}q$ 聚合酶反应缓冲液 5 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 5 μL , dNTP (2.5 mmol/L each) 5 μL , F27 (25 pmol/ μL) 1 μL , R1492 (25 pmol/ μL) 1 μL , 少许菌体, $\text{Ta}q$ DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 0.6 μL , 吐温 20 (10%) 4 μL , 扩增 ITS rDNA 区段。PCR 扩增程序为: 94°C 3 min; 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 5 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测,PCR 产物经试剂盒纯化后送至上海生工生物技术有限公司测序后,将获得的 DNA 序列输入 GenBank,用 Blast 程序与数据库中的所有序列进行比较分析,利用 MEGA4.1 的 Neighbor-Joining 软件进行系统发育树的构建。

2 结果

2.1 溶磷菌的初筛

经初筛,共得到 10 株具有明显溶磷圈 ($D/d \geq 1.5$) 的溶磷菌,其中 9 株细菌来源于长期无机肥试验地,其中施 NPKCa 处理的 4 株,分别记为 C2-C、C2-D、C2-E、C2-F;施 NPK 处理 4 株,记为 C3-A、C3-B、C3-C、C3-E;施 NK 处理 1 株,记为 C5-A;有机试验地只有 1 株,源于绿肥处理,记为 B1-D,10 株溶磷菌溶磷能力差异较大,在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 平板上培养 4 天时菌株的 D/d 比在 1.50 - 2.40 之间,其中大多

数菌株 D/d 在 2.00 以上,具有较好的溶磷效果。

2.2 溶磷菌的复筛

将分离的 10 株细菌在 NBRIP 液体培养基中进行液体发酵试验,摇瓶培养 7 天后测得发酵液中有有效磷含量见表 1。

由表 1 可知:10 株溶磷菌对 5.0 g/L 的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 溶液呈现不同的溶解能力,溶磷量在 44.68 mg/L - 125.79 mg/L 之间,均显著的高于对照 ($P < 0.05$)。菌株 C5-A 溶磷量最高为 125.79 mg/L,与其它菌株的溶磷量差异显著,比较各菌株的 D/d 与溶磷量可以发现:C5-A 并非是 D/d 最高的,但其溶磷量最高,因此本实验中选择 C5-A 作进一步研究。摇瓶培养 7 天后 10 株溶磷菌培养液的 pH 均有不同程度的下降,降幅均小于 2 个单位,但对照 pH 较初始值略有上升,可能由于 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 中释放出少量的 Ca^{2+} 致使发酵液 pH 升高。

表 1 液体摇瓶培养条件下第 7 天溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的效果 ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g/L)

Table 1 Dissolution rate of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ in the culture on the 7th day

strains	P solubilization capacity (mg/L)	Final pH	pH drop-out value
CK	28.1 \pm 1.56 g	7.20	-0.20
C2-C	54.16 \pm 4.36 de	5.18	1.82
C2-D	61.99 \pm 8.07 cd	5.36	1.64
C2-E	44.68 \pm 3.03 f	5.03	1.97
C2-F	56.74 \pm 5.11 de	5.36	1.64
C3-A	53.39 \pm 3.02 ef	5.63	1.37
C3-B	72.24 \pm 4.51 b	5.10	1.90
C3-C	65.35 \pm 5.53 bc	5.04	1.96
C3-E	68.62 \pm 6.96 bc	5.59	1.41
C5-A	125.79 \pm 12.85 a	5.46	1.54
B1-D	57.91 \pm 2.93 de	5.22	1.78

Difference in letter following the table shows significant difference at 0.05 level, the same below.

2.3 菌株 C5-A 遗传稳定性试验

将 C5-A 接种到 LB 斜面培养基上进行传代培养,同时测定每代的溶磷量,从表 2 可看出,C5-A

溶磷量较为稳定,在传代 12 代的试验中,溶磷量基本稳定在 124.25 ± 8.93 mg/L 范围内,差异不显著。说明 C5-A 菌株有稳定遗传的特性,具有一定的应用前景。

表 2 C5-A 遗传稳定性试验

Table 2 The heredity stability of C5-A

P solubilization capacity (mg/L)	Generations					
	G2	G4	G6	G8	G10	G12
	128.64 \pm 8.36a	126.35 \pm 10.55a	123.95 \pm 6.68a	120.08 \pm 8.05a	122.5 \pm 10.4a	124 \pm 9.55a

2.4 菌株 C5-A 的鉴定

2.4.1 革兰氏染色与生理生化鉴定:菌株 C5-A 为短杆状,革兰氏染色阴性,具运动性,生理生化反应结果显示,菌株 C5-A 能利用丙二酸盐、柠檬酸盐,甲基红反应、V-P 反应、吲哚反应均为阴性,明胶液化、接触酶测定、硝酸盐还原呈阳性,葡萄糖氧化型,不产生 H_2S ,不能使淀粉水解,能较好的利用甘露糖、蔗糖、糊精、D-果糖。

2.4.2 16S rRNA 基因鉴定:以菌株 C5-A 的总 DNA 为模板,利用细菌 16SrRNA 引物进行 PCR 扩增,得到长度约为 1.5 kb 的扩增产物。菌株 C5-A 的 16S rRNA 序列 Genbank 登录号为 JN571420。根据 GenBank 序列同源性比较,菌株 C5-A 是伯克霍尔德里氏菌属,与 *Burkholderia cepacia* strain ATCC 17765 (AY741336.1)、*Burkholderia cepacia* strain ATCC 53933 (AY741357.1)、*Burkholderia cepacia* strain ATCC 53267 (AY741352.1) 的序列同源性均大于 99%,结合生理生化鉴定结果,故将菌株 C5-A 鉴定为洋葱伯克霍尔德里氏菌 (*Burkholderia cepacia*)。

2.5 C5-A 对 4 种不同形态难溶磷酸盐的溶磷效果

经筛选菌株 C5-A 无论在 $Ca_3(PO_4)_2$ 固体还是在发酵液中均具有较强的溶磷能力,为进一步验证 C5-A 的溶磷能力,分析测定了 C5-A 对磷酸铝和磷酸铁的动态溶磷特性和对不同浓度 (3 g/L、5 g/L) 的两种磷矿粉的溶磷效果。

2.5.1 C5-A 对磷酸铝、磷酸铁的动态溶磷特性:将菌株 C5-A 在接种发酵液中 24 h 后开始测定菌液中溶磷量及 pH,以后每隔 48 h 各测定 1 次,溶磷量结果见图 1。

由图 1 可知:菌株 C5-A 对不同磷酸盐的溶磷特性有较大差异, $AlPO_4$ 和 $FePO_4$ 发酵液中溶磷量均在 120 h 后趋于稳定,在 $AlPO_4$ 发酵液中最高溶磷量为 227.34 mg/L,在 $FePO_4$ 发酵液中最高溶磷量只有 60.02 mg/L,差异显著 ($P < 0.005$)。 $AlPO_4$ 发酵液中,216 h 时溶磷量较 168h 时溶磷量略有下降,可能是由于培养液中细菌对底物的消耗导致细菌生长能源不足,从而降低了细菌分泌有机酸的量以及细菌的溶磷活性^[20],使得培养液中部分可溶性磷又重新和钙结合,并沉淀下来。

2.5.2 C5-A 对不同浓度的两种磷矿粉的溶磷特性:为进一步确定 C5-A 的溶磷特性,将 C5-A 接种至不同浓度的两种磷矿粉中培养 7 天,结果见图 2。

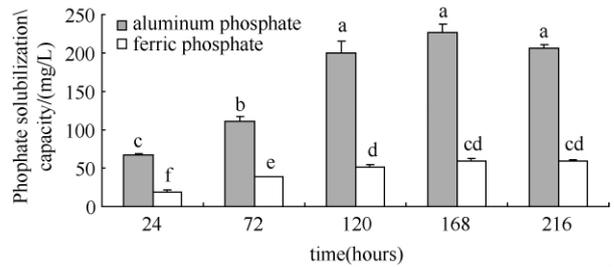


图 1 $AlPO_4$ 和 $FePO_4$ 培养液中溶磷量随时间的变化

Fig. 1 P dissolution rate and pH in $AlPO_4$ and $FePO_4$ culture medium during solubilizing period.

图 2 结果表明,菌株 C5-A 对不同浓度两种磷矿粉均有较好的溶磷效果,有效磷含量按云南 (3、5 g/L) 和江西 (3、5 g/L) 分别为 321.15、279.38、85.27、149.55 mg/L,对云南磷矿粉的溶磷效果要显著高于江西磷矿粉。菌株 C5-A 在 5 g/L 的云南磷矿粉比在 3 g/L 的溶磷量要显著偏低;在 5 g/L 的江西磷矿粉比 3 g/L 的溶磷量要显著偏高,说明溶磷菌的溶磷量受磷矿粉的来源和浓度的影响,并非浓度越高溶磷量越大。

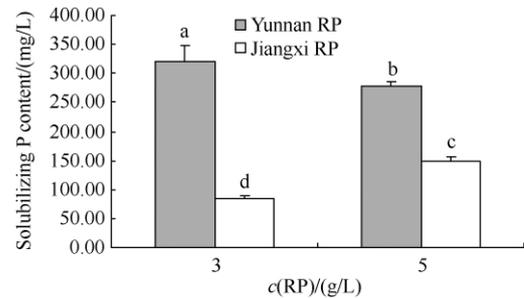


图 2 不同磷矿粉浓度对培养液中溶磷量的影响

Fig. 2 Effect of RPP concentration on phosphate dissolution rate in the solution. Different superscript letters in the figure indicate significant difference at 0.05 levels.

2.6 不同碳源、氮源对溶磷菌 C5-A 溶磷量的影响

溶磷微生物溶解难溶磷酸盐的能力,主要受菌株的遗传特性的影响,同时也与培养条件有关。为此需进一步分析培养基中氮源、碳源都对菌株溶磷量的影响。

2.6.1 不同碳源对 C5-A 溶磷量的影响:菌株 C5-A 在含有不同碳源的无机磷液体培养基中培养 7d 后,测定发酵液中溶磷量表明,不同碳源对溶磷菌溶解 $Ca_3(PO_4)_2$ 能力差异很大(图 3-A),当以麦芽糖为碳源时发酵液中溶磷量最高为 299.14 mg/L,是以葡萄糖为碳源时的 2.39 倍,以麸皮和蔗糖为碳源时

的溶磷量较葡萄糖和麦芽糖显著偏低,可能是由于菌株 C5-A 在发酵过程中能较好的利用还原性糖,对非还原性糖利用效果较差。以麦芽糖为碳源时溶磷量最高,溶液 pH 最低,蔗糖为碳源时溶磷量最低,溶液 pH 最高。

2.6.2 不同氮源对菌株 C5-A 溶磷量的影响:由图 3-B 可知,不同氮源显著影响菌株的溶磷能力,C5-A 以草酸铵和硫酸铵为氮源时的溶磷量较尿素和硝酸钾显著偏高,以草酸铵和硫酸铵为氮源时溶磷量分别为 498.88 mg/L 和 298.20 mg/L,以尿素和硝酸钾为氮源时溶磷量分别为 75.94 mg/L 和 34.06 mg/L,说明菌株 C5-A 对铵态氮利用效果较硝态氮和尿素好。以草酸铵为氮源时 pH(3.16)最低,而以硝酸钾为氮源时,pH(4.35)最高,进一步说明溶磷量与 pH 的负相关性。

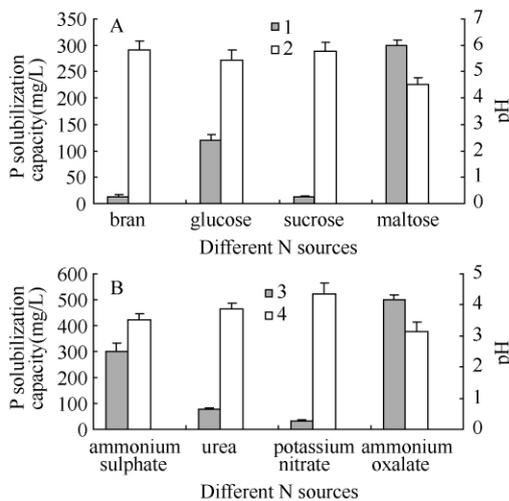


图 3 不同碳氮源对溶磷量的影响

Fig. 3 Effect of different C (A) and N (B) sources on phosphate dissolution rate in the solution. 1 3 to indicate P solubilization capacity;2 4 to indicate pH.

2.7 pH 与溶磷量、氮源与有机酸的关系

2.7.1 pH 与溶磷量的关系:比较 C5-A 在两种磷酸

盐中的溶磷量和 pH 变化情况(图 4)可知,在 FePO₄ 和 AlPO₄ 发酵液中溶磷量均先升高后稳定,pH 先下降后稳定,经计算可知菌株 C5-A 在 FePO₄ 和 AlPO₄ 发酵液中溶磷量与 pH 的相关性系数分别为 R₁² = 0.885 和 R₂² = 0.555 (P < 0.01),表明 C5-A 的溶磷量与 pH 呈极显著负相关,C5-A 在 FePO₄ 和 AlPO₄ 溶液中 pH 在 24h 均由初始 pH7.0 迅速下降至 pH3.0 左右,之后 pH 变化趋于平缓,与 Miguel Sulbaran^[21] 研究结果一致,说明该菌的产酸能力很强,在酸性红壤中可能具有较强的定殖能力。

2.7.1 不同氮源对有机酸的影响:HPLC 分析表明,不同氮源对有机酸的种类和浓度有很大影响,菌株 C5-A 在以麦芽糖为碳源,以草酸铵、硫酸铵为氮源时只产生乙酸;以硝酸钾为氮源时主要产生草酸;以尿素为氮源时,产生草酸、柠檬酸、琥珀酸和 5 种未知有机酸。不同氮源条件下有机酸的种类、浓度的影响见表 3。

从表中可以看出不同氮源对有机酸的种类和浓度有很大影响,4 种氮源发酵液中均产生较高浓度的有机酸,NH₄⁺-N 发酵液中产生乙酸;NO₃⁻-N 发酵液中产生草酸;以尿素为氮源时产生草酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸等多种主要有机酸以及未知酸 1-5,尿素对有机酸的种类影响最大。比较有机酸与溶磷量关系时可以发现乙酸含量越高溶磷量越高,乙酸含量的高低可能是决定溶磷量高低的重要因素。

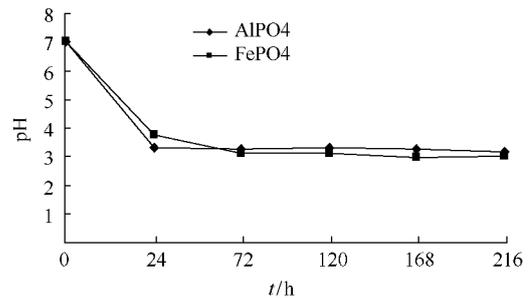


图 4 AlPO₄ 和 FePO₄ 培养液中 pH 随时间的变化

Fig. 4 pH variation in AlPO₄ and FePO₄ culture medium during solubilizing period.

表 3 不同氮源对有机酸种类和浓度的影响

Table 3 Effect of different N sources on nature and concentration of organic acid

N source	Organic acid / (mg/L)						
	Oxalic acid	Acetic acid	Malic acid	Lactic acid	Citric acid	Succinic acid	Unknown acids 1-5
ammonium oxalate	-	627.1 ± 16.3	-	-	-	-	-
ammonium sulphate	-	487.5 ± 10.5	-	-	-	-	-
urea	50.8 ± 3.4	-	299.2 ± 12.3	-	268.8 ± 8.7	149.0 ± 9.2	NC
potassium nitrate	1017.9 ± 14.3	-	-	-	-	-	-

"-" indicates not detected. NC indicates not calculated.

3 讨论

不同碳源和氮源对微生物产生有机酸的种类和浓度有很大影响,某些溶磷菌接种到作物根际未能促进作物生长可能与微生物的溶磷活性受到土壤中碳氮源的限制有关,碳源和氮源通过影响产生有机酸的种类和浓度进而影响溶磷量^[22],一些研究比较了不同氮源对溶磷菌溶磷能力的影响时认为铵态氮是最好的氮源,溶磷菌不能利用硝态氮^[23-24],Lu^[25]等人研究表明淀粉是黑曲霉最好的碳源,在淀粉作为碳源时黑曲霉产生有机酸含量和溶磷量最高,Relwani^[18]研究表明葡萄糖和乳糖是 *Aspergillus tubingensis* 较好的碳源,本实验结果说明麦芽糖和葡萄糖是较好的碳源,草酸铵和硫酸铵是较好的氮源,其中还原糖溶磷效果优于非还原糖,铵态氮对溶磷菌溶磷效果显著优于硝态氮,分别以麦芽糖和草酸铵为碳源和氮源时溶磷效果最佳。

范炳全^[26]研究不同氮源对有机酸的影响时认为使用铵态氮时主要分泌苹果酸、乙酸、丙酸、柠檬酸、琥珀酸,而硝态氮条件下几乎不再产生这些有机酸,Reyes I^[22]等人研究表明以铵态氮为氮源时时葡萄糖酸和柠檬酸含量显著降低,溶磷量降低。本次实验菌株 C5-A 在铵态氮与硝态氮溶液中均只产生一种有机酸分别为乙酸和草酸,在尿素溶液中产生草酸、苹果酸、柠檬酸、琥珀酸和未知酸 1-5 等多种有机酸,且各种有机酸的含量各不相同,原因有待进一步分析。

目前,关于溶磷菌的溶解无机磷机理一般被认为是由于土壤微生物在生长过程中产生各种有机酸^[13-15],葡萄糖酸(草酸)是大多数溶磷菌产生的最主要的有机酸,此外,还包含柠檬酸、乳酸、乙酸、丙酸、琥珀酸等多种有机酸^[27-29]。这些有机酸一方面通过降低培养液 pH,另一方面通过螯合作用与铁、铝、钙、镁等离子结合,从而使难溶性的磷酸盐溶解。比较 C5-A 产生有机酸的种类和浓度可以发现:产生的有机酸的总浓度与溶磷量无必然联系,与 Scervino^[30]等人研究结果一致,在 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ 发酵液中只产生乙酸,溶磷量较高;在尿素和 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ 发酵液中只产生草酸而未产生乙酸,溶磷量较低,说明乙酸含量的高低可能是决定溶磷量高低的重要因素。

目前,关于我国红壤地区溶磷菌的报道并不多

见,黄伟等^[31]从江西红壤试验站菜园地中筛选到一株溶磷菌 CY 06,其对难溶性磷酸盐的溶磷量在 26.49 - 336.64mg/L 之间。戴沈艳等^[32]从江西红壤试验站的稻田耕作层土壤中分离到一株具较强溶磷能力的细菌 Y 5,菌株 Y 5 虽然在 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 溶液中溶磷量为 159.1 mg/L,但对 AlPO_4 和 FePO_4 的溶磷量很低,仅分别为 2.1 mg/L 和 1.2 mg/L,戴沈艳^[32]通过对菌株 Y 5 紫外诱变得菌株 Y 8,其对 AlPO_4 和 FePO_4 溶磷量仅分别为 12.2 mg/L 和 3.14 mg/L。而菌株 C5-A 对 AlPO_4 和 FePO_4 溶磷量分别为 227.34 mg/L 和 60.02 mg/L,对 4 中难溶性磷酸盐的溶磷量在 60.02 - 321.15 mg/L,对磷矿粉的最高溶磷量为 321.15 mg/L,较 CY 06 和 Y 5 有一定的溶磷优势,有望与磷矿粉肥混合施用,提高红壤磷素利用、开发红壤高效微生物磷肥提供种质资源。

参考文献

- [1] Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. Simultaneous Psolubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006b, 71(2):137-144.
- [2] Vassilev N, Medina A, Azcon R, Vassileva M. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake. *Plant Soil*, 2006a, 102(1):77-84.
- [3] Johnson SE, Loeppert RH. Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide. *Soil Science Society of America Journal*, 2006, 70(1): 222-234.
- [4] Rengel Z, Marschner P. Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist*, 2005, 168(2): 305-312.
- [5] Shigaki F, Sharpley AN, Prochnow LI. Animal-based agriculture, phosphorus and management and water quality in Brazil: options for the future. *Science of Agriculture*, 2006, 63(2):194-209.
- [6] Wakelin SA, Warren RA, Harvey PR, Ryder MH. Phosphate solubilization by *Penicillium* sp. closely associated with wheat roots. *Biology and Fertility of Soils*, 2004, 40(1):36-43.
- [7] Toro M, Azcon R, Barea JM. Improvement of arbuscular mycorrhiza development by inoculation of soil with phosphate-solubilizing rhizobacteria to improve rock

- phosphate bioavailability (P-32) and nutrient cycling. *Applied Environment Microbiology*, 1997, 63 (11): 4408-4412.
- [8] Hameeda B, Rupela OP, Reddy G, Satyavani K. Application of plant growth-promoting bacteria associated with composts and macrofauna for growth promotion of Pearl millet (*Pennisetum glaucum* L.). *Biology and Fertility of Soils*, 2006, 43(2): 221-227.
- [9] Antoun H, Babana AH. Effect of Tilemsi phosphate rock-solubilizing microorganisms on phosphorus uptake and yield of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) in Mali. *Biomedical And Life Sciences*, 2006, 287(1): 51-58.
- [10] Wani PA, Khan MS, Zaidi A. Chromium reduction plant growth-promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. *Current Microbiology*, 2007, 54(3): 237-243.
- [11] Goldstein A H. Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture and Horticulture*, 1995, 12(2): 185-193.
- [12] Puente ME, Bashan Y, Li CY, Lebsky VK. Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. I. Root colonization and weathering of igneous rocks. *Plant Biology*, 2004, 6(5): 629-642.
- [13] Kim KY, Jordan D, Krishnan HB. *Rahnella aquatilis*, a bacterium isolated from soybean rhizosphere, can solubilize hydroxyapatite. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 153(2): 273-277.
- [14] Kpombekou K, Tabatabai MA. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Science*, 1994, 158(6): 442-453.
- [15] 杨芳,何园球,李成亮. 不同施肥条件下红壤旱地磷素形态及有效性分析. *土壤学报* (*Acta Pedologica Sinica*), 2006, 43(5): 794-799.
- [16] Gupta R, Singal R, Shankar A. A modified plate assay for screening phosphate solubilizing microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology*. 1994, 40(3): 255-260.
- [17] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate-solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(1): 265-270.
- [18] 中国科学院微生物研究所. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第九版. 北京: 科学出版社, 1994.
- [19] Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [20] Kim YH, Bae EB, Choung YK. Optimization of biological Phosphorus removal From contaminated sediments with Phosphate solubilizing microorganisms. *Bioscience and Bioengineering*, 2005, 1(1): 23-29.
- [21] Miguel S, Elizabeth P, Maria M, Ball, Bahsas A. Characterization of the Mineral Phosphate-Solubilizing Activity of *Pantoea agglomerans* MMB051 Isolated from an Iron-Rich Soil in Southeastern Venezuela (Bolivar State). *Current Microbiology*, 2009, 58(4): 378-383.
- [22] Reyes I, Bernier L, Simard RR, Antoun H. Effect of nitrogen source on the solubilization of different inorganic phosphates by an isolate of *Penicillium rugulosum* and two UV-induced mutants. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 28(3): 281-290.
- [23] Wenzel CL, Ashford AE, Summerell BA. Phosphate-solubilizing bacteria associated with proteoid roots of seedlings of waratah [*Telopea speciosissima* (Sm.) R. Br.]. *New Phytologist*, 1994, 128(3): 487-496.
- [24] Vora MS, Shelath HN. Impact of addition of different carbon and nitrogen sources on solubilization of rock phosphate by phosphate-solubilizing micro-organisms. *Indian Journal of Agricultural Science*, 1997, 68(6): 292-294.
- [25] Lu LL, Shu YQ. Effect of Different Carbon Sources on Phosphate-Solubilizing Fungi Isolated from Phosphate Mines. International Conference on Computer Distributed Control and Intelligent Environmental Monitoring, 2011, pp, 1124-1127.
- [26] 范丙全,金继运,葛诚. 溶磷草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究. *中国农业科学* (*Scientia Agricultura Sinica*), 2002, 35(5): 525-530.
- [27] Vassilev N, Massimiliano F, Federico F. Rock phosphate solubilization with gluconic acid produced by immobilized *Penicillium variable* P16. *Bioresource Technology*, 1996, 10(8): 585-588.
- [28] Hwangbo H, Park RD, Kim YW, Rim YS. 2-ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedium*. *Current Microbiology*, 2003, 47(2): 87-92.
- [29] Patel DK, Archana G, Kumar GN. Variation in the nature of organic acid secretion and mineral phosphate solubilization by *Citrobacter* sp. DHRSS in the presence of different sugars. *Current Microbiology*, 2008, 56(2): 168-174.

- [30] Scervino JM, Papinutti VL, Godoy MS, Rodriguez MA, Monica D, Recchi M, Pettinari MJ, Godeas AM. Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production. *Journal of Applied Microbiology*, 2011, 110(5): 1215-1223.
- [31] 黄伟, 胡峰, 吴洪生, 李辉信. 红壤溶磷菌的筛选及溶磷能力的比较. *生态与农村环境学报 (Journal of Ecology And Rural Environment)*, 2006, 22(3): 37-40.
- [32] 戴沈艳, 贺云举, 申卫收, 钟文辉, 彭毅. 一株高效解磷细菌的紫外诱变选育及其在红壤稻田施用效果. *生态环境学报 (Ecology and Environmental Sciences)* 2010, 19(7): 1646-1652.

Isolation, identification and characterization of a strain of phosphate-solubilizing bacteria from red soil

Wengan Liu^{1,2}, Yuanqiu He², Kun Zhang¹, Jianbo Fan², Hui Cao^{1*}

¹ Key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Microbiology Department, College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

² Nanjing Institute of Soil Science, Chinese Academy Sciences, Nanjing 210008, China

Abstract: [Objective] To improve use efficiency of phosphorus in latosolic red soil and to explore mechanism of phosphate solubilization. [Methods] Pikovskaya and National Botanical Research Institute's Phosphate broth were used to isolate a phosphate-solubilizing bacterium coded as C5-A from the rhizosphere soil of peanut. According to its morphological, physiological, biochemical properties and its 16S rRNA sequence, its position in phylogenetic development tree was defined. By measuring changes in pH of the National Botanical Research Institute's Phosphate solution in which C5-A was incubated, phosphate solubilizing capacity was determined. Through fermentation, effects of carbon and nitrogen sources on the capacity of strain C5-A were investigated. Kinds and concentrations of organic acids in the cultures different in N sources were also determined by HPLC. [Results] The strain was identified as *Burkholderia cepacia*, which is stable in hereditary. In aluminum phosphate and ferric phosphate solutions, its P solubilizing capacity was negatively related to pH. It solubilized tricalcium phosphate, aluminum phosphate, ferric phosphate and rock phosphates powder, and could dissolve as much as 125.79 mg/L, 227.34 mg/L, 60.02 mg/L and 321.15 mg/L P, respectively. For RPP, P solubilizing capacity of the strain was related to type and concentration of the powder. When using maltose and ammonium oxalate as C and N sources, the strain displayed its highest P solubilizing capacity. HPLC analysis detected 10 organic acids in the culture, namely: oxalic acid, acetic acid, malic acid, lactic acid, citric acid, succinic acid and 5 unknown organic acids. Interestingly, it is acetic acid rather than gluconic acid being the most important organic acid affecting P solubilization. [Conclusion] The strain isolated from the rhizosphere soil of peanut plants growing in a red soil field can dissolve hard-to-solve inorganic salts, and is a promising microbial resource for development of high efficiency biological phosphorus fertilizer for latosolic red soil.

Keywords: phosphate-solubilizing bacteria, P solubilizing capacity, identification, organic acids, carbon sources, nitrogen sources, pH

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Ministry of Science and Technology (2009BAD6B04, 2009BAD6B003-3, 2011BAD31B04) and by the National Natural Science Foundation of China (40871125, 30971869)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-84396753; E-mail: hcao@njau.edu.cn

Received: 20 August 2011 / Revised: 13 December 2011