

## 一株烟草根际溶磷细菌的筛选鉴定及其培养基优化

刘虎<sup>1</sup>,侯贞<sup>1</sup>,易建华<sup>2\*</sup>,周东波<sup>2</sup>,周曙光<sup>2</sup>,刘凯<sup>1</sup>,汪城墙<sup>1</sup>,丁延芹<sup>1</sup>,杜秉海<sup>1\*</sup>

1. 山东农业大学生命科学学院/山东省农业微生物重点实验室, 山东 泰安 271018  
2. 湖南中烟工业有限责任公司技术研发中心, 湖南 长沙 410007

**摘要:** 溶磷微生物可以加速土壤磷素循环, 促进植物生长, 具有较好的应用前景。本试验以无机磷为唯一磷源的选择性培养基从烟田土壤中筛选具有溶磷功能的细菌, 同时分别运用钼锑抗显色法、Salkowski显色法对其溶磷能力、产IAA能力进行检测。通过生理生化特征和16S rRNA测序对溶磷效果较好的菌株JP6进行鉴定。通过模拟试验验证JP6对土壤中有效磷释放的影响; 运用单因子试验确定最佳碳源、有机氮源、无机氮源和无机盐, 并通过正交试验进行培养基配比优化。结果显示: 菌株JP6具有较好的溶磷能力, 发酵液中有有效磷含量为50.1 mg/L, 同时该菌株具有产IAA能力, 在R<sub>2</sub>A培养基中分泌IAA含量为128.9 μg/mL, 通过生理生化和16S rRNA序列比对将JP6鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*), 在土壤中具有较好的溶磷作用, 最佳培养基配比为在10%黄豆芽基础上1.5%葡萄糖, 2%豆粕, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 0.5% CaCO<sub>3</sub>。

**关键词:** 溶磷细菌; 阴沟肠杆菌; 筛选; 鉴定; 培养基优化

**中图分类号:** S154.39

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2016)04-0514-06

## Isolation and Identification of Tobacco Rhizosphere Phosphate Solubilizing Bacteria and Optimization of Medium

LIU Hu<sup>1</sup>, HOU Zhen<sup>1</sup>, YI Jian-hua<sup>2\*</sup>, ZHOU Dong-bo<sup>2</sup>, ZHOU Shu-guang<sup>2</sup>,  
LIU Kai<sup>1</sup>, WANG Cheng-qiang<sup>1</sup>, DING Yan-qin<sup>1</sup>, DU Bing-hai<sup>1\*</sup>

1. College of Life Sciences/Shandong Agricultural University; Shandong Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Taian 271018, China  
2. Research & Development Center of China Tobacco Hunan Industrial Co. Ltd, Changsha 410007, China

**Abstract:** The phosphate-solubilizing bacterium was isolated with selective medium in this test. The strain was identified by 16S rRNA sequence analysis and biological characteristics including phosphate solubilization and IAA secretion. The capability of phosphate-solubilization and the production of IAA were detected by the method of Mo-Sb colorimetry and Salkowski colorimetry. The effect of JP6 on available phosphorus in soil was verified by simulated experiments. The one factor test and the orthogonal test were used for the optimization of a liquid culture medium for *Enterobacter cloacae* JP6. The results showed that JP6 possessed the capacity of phosphate solubilization. The available phosphorus was dissolved by JP6 as high as 50.1 mg/L in liquid culture medium. IAA was secreted by JP6 as high as 128.9 μg/mL in the R<sub>2</sub>A medium. With the cultural and morphological characteristics, combined with 16s rRNA sequence analysis, the strain JP6 was identified as *Enterobacter cloacae*. When the culture medium containing 10% soybean sprouts, 1.5% glucose, 2% soybean meal, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, and 0.5% CaCO<sub>3</sub>, the growth of *Enterobacter cloacae* could increase significantly. It has a good role in dissolving phosphorus. The optimized culture medium could promote the growth of JP6 effectively.

**Keywords:** Phosphate-solubilizing bacteria; *Enterobacter cloacae*; isolation; identification; optimization of medium

磷素是植物生长所需的重要元素, 可以促进细胞分裂, 提高植物的抗旱能力, 同时影响植物的光合作用<sup>[1,2]</sup>以及呼吸作用。磷素在土壤中广泛存在, 施用磷肥的70%~90%被固定在土壤中变成无效磷, 无法被植物利用<sup>[3,4]</sup>。大量使用磷肥会增加生产成本, 引起环境污染, 同时会降低农产品的品质, 土壤板结<sup>[5]</sup>。具有溶磷能力的植物根际促生细菌(PGPR)能够将土壤中难溶性磷转化为有效磷, 为植物提供养分<sup>[6]</sup>; 产生生长素也是PGPR直接促生机制之一<sup>[7]</sup>。细菌分泌的3-吲哚乙酸(IAA)可以增强细胞的渗透吸水能力<sup>[8]</sup>, 也会激发植物自身激素的分泌, 从而促进植物的生长, 但是也有报道单纯具有产IAA功能的菌株对作物的促生效果不明显<sup>[9]</sup>。因此利用土壤微生物的生命活动加速土壤中的磷素循环、提高植物磷素利用率, 同时利用细菌产生生长素共同促进植物生长具有良好的应用前景。

文献报道的溶磷细菌有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、

收稿日期: 2016-04-19

修回日期: 2016-06-16

基金项目: 湖南中烟工业有限责任公司科技项目(2011-yc-0002); 山东省重大科技专项(2015ZDXX0502B02)

作者简介: 刘虎(1990-), 男, 山东临沂人, 在读硕士研究生, 研究方向: 环境微生物学。E-mail: liuhu20090905@163.com

\*通讯作者: Author for correspondence. E-mail: yijh0516@hngyotobacco.com; du\_binghai@163.com

土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium*)、固氮菌属 (*Azotobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、沙雷氏菌 (*Serratia*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、肠细菌属 (*Enterbacter*)、微球菌属 (*Micrococcus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、色杆菌属 (*Chromobacterium*)、节细菌属 (*Arthrobacter*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、布克氏菌属 (*Burkholderia*)、劳尔氏菌属 (*Ralstonia*)、泛菌属 (*Pantoea*)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) [10-15]。陆瑞霞[16], 李晓举[17]和李明新[18]已报道阴沟肠杆菌具有溶磷功能, 但是同时具有溶磷和产生长素功能的阴沟肠杆菌少有报道。

本研究利用无机磷培养基在湖南浏阳烟科所烟田土壤中筛选出一株同时具有溶磷和产生长素功能的阴沟肠杆菌, 同时对JP6进行土壤溶磷模拟试验和培养基优化试验, 为该菌的工业化生产和田间应用提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 土样 土样取自湖南省浏阳烟科所烟田烟草根际, 存于密封袋中, 4℃保存。

1.1.2 培养基与试剂 无机磷液体培养基: 葡萄糖 10 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.5 g, NaCl 0.3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.3 g,  $\text{FeSO}_4$  0.03 g,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.03 g;  $\text{CaCO}_3$  5.0 g, KCl 0.3 g,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  10 g, 蒸馏水定容至 1000 mL, pH值 7.2~7.4。其中 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 单独称量, 每 100 mL分装 1 g。121℃灭菌 20 min。

无机磷固体培养基: 同上添加琼脂 18~20 g。

R<sub>2</sub>A培养基: 酵母粉 0.5 g, 胰蛋白胨 0.5 g, 酪蛋白氨基酸 0.5 g, 葡萄糖 0.5 g, 可溶性淀粉 0.5 g, 磷酸氢二钾 0.3 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05 g, 丙酮酸钠 0.3 g溶于 1 L水中, 用 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 和 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 将pH调至 7.2, 121℃灭菌 20 min。

初始发酵培养基: 黄豆芽 100 g, 蔗糖 50 g, pH自然。新鲜黄豆芽 100 g, 加水 100 mL, 煮沸 30 min, 用纱布过滤。用水补足原量, 再加入蔗糖 50 g, 煮沸溶化。121℃灭菌 20 min。

LB培养基: 酵母膏 5 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 10 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水定容至 1000 mL pH 7.0, 121℃灭菌 20 min。

Salkowski显色液: 500 mL 35%  $\text{HClO}_4$ , 10 mL 0.5 mol/L  $\text{FeCl}_3$ 。

### 1.2 方法

1.2.1 溶磷菌的分离纯化 称新鲜土壤 10 g, 置于内含玻璃珠和 90 mL 无菌水的 250 mL 三角瓶中, 170 r/min 振荡 30 min, 然后系列梯度稀释, 将  $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  梯度取 0.1 mL 涂布于无机磷培养基平板上, 每个梯度重复 3 次, 置于 28℃培养 24~48 h。采用溶磷圈方法[19]筛选, 挑取产生透明圈的分离物进行纯化。将纯化的细菌分离物点接到无机磷培养基上, 28℃, 培养 4 d, 测定溶磷圈直径 D, 菌落直径 d, 并测量溶磷比 (溶磷圈直径/菌落直径), 筛选出效果较好的菌株。

1.2.2 溶磷菌发酵液有效磷含量测定 采用钼锑抗显色方法[20]对初筛效果较好的菌株进行溶磷能力测定。具体操作如下: (1) 绘制标准曲线: 在 6 个 50 mL 容量瓶中分别加入 0 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL 的 100 mg/mL 的磷标准溶液, 加 2 滴 2,6-二硝基苯酚作为指示剂, 加钼锑抗显色剂 5 mL, 定容至刻度, 使标准磷浓度分别为 0 mg/L、0.2 mg/L、0.4 mg/L、0.6 mg/L、0.8 mg/L、1.0 mg/L, 摇匀。在室温下反应 30 min 后, 用紫外分光光度计在 720 nm 处比色, 根据结果绘制标准曲线。(2) 发酵液制备: 将活化好的菌株接种到 LB 斜面培养基上, 37℃培养 2 d。将生长好的菌苔用无菌水进行适当稀释, 制成  $10^8$  cfu/mL 菌悬液。按 1% 接种量接至 50 mL 液体溶磷培养基中, 对照以无菌水代替, 每处理 5 个平行, 180 r/min, 30℃, 摇床中培养 4 d。(3) 测定方法: 将发酵液转移至离心管, 超声波细胞粉碎处理 20 min; 4000 rpm/min, 离心 20 min 后吸取上清液待测; 吸取适量上清液于 50 mL 容量瓶中, 用水稀释至总体积约 3/5 处, 加入 2~3 滴 2,4-二硝基酚, 并调 pH 至溶液刚呈微黄色, 加入 5 mL 钼锑抗试剂, 摇匀, 加水定容, 室温放置 30 min, 720 nm 处比色。根据标准曲线算出磷浓度, 并计算发酵液中有效磷含量。

1.2.3 产 IAA 能力测定 采用 Salkowski 显色方法[21], 计算菌浓度  $\text{OD}_{600}$  值为 1 时, 单位体积发酵液中 IAA

含量;标准曲线由 100  $\mu\text{g/mL}$  的分析纯 IAA 标准液系列稀释 0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0, 25.0  $\mu\text{g/mL}$ , 显色方法同上, 分光光度法测定  $\text{OD}_{530}$ , 以  $\text{OD}_{530}$  为横坐标, IAA 浓度为纵坐标绘制标准曲线。

**1.2.4 溶磷菌株的鉴定** 溶磷菌的 16S rRNA 鉴定: 对纯化的菌株进行液体培养, 利用细菌基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技(北京)有限公司生产)提取细菌总 DNA。采用细菌通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系为 25  $\mu\text{L}$  体系: 10 $\times$  缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ , Taq 酶 0.5  $\mu\text{L}$ , dNTPs 2  $\mu\text{L}$ , 引物 27F 0.5  $\mu\text{L}$ , 引物 1492R 0.5  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 18  $\mu\text{L}$ 。反应程序设定为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 50 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min, 循环次数 30 次, 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。将 PCR 扩增产物送往上海铂尚生物公司测序。测序结果使用 NCBI 数据库比对, 并构建系统进化树。

生理生化鉴定: 将菌株接种到 LB 固体培养基上, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养 24 h, 对菌株进行菌落形态描述, 并根据《常用细菌系统鉴定手册》<sup>[22]</sup> 对菌株进行革兰氏染色以及生理生化鉴定。

**1.2.5 模拟条件下 JP6 对土壤有效磷释放的影响** 取 250 g 研磨过筛后的土于 250 mL 三角瓶中, 接种培养至对数期的 JP6 菌液, 每瓶按 18% 接种量添加于上述三角瓶中混匀, 调整土壤湿度为最大持水量的 60%, 然后用棉塞封闭三角瓶, 在培养箱中 25  $^{\circ}\text{C}$  避光培养, 每 20 d 取样 1 次, 测定土壤中有效磷含量, 测定方法参照《土壤农化分析》<sup>[23]</sup>。

**1.2.6 培养基优化** 将活化好的菌种接种到 LB 培养基, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 190 r/min, 摇床培养 10 h, 制成种子液。

(1) 单因子试验: 最佳碳源的筛选: 在初始发酵培养基中分别加入 2% 蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、乳糖、玉米粉和可溶性淀粉作为碳源替代蔗糖 50 g, 按 0.2% 的接种量向培养基中接种种子液, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 190 r/min, 摇床培养 15 h, 测定  $\text{OD}_{600}$  的吸光值。

最佳有机氮源的筛选: 在发酵培养基中分别加入 1% 氮源(蛋白胨、酵母粉、豆饼粉)作为氮源, 碳源为最佳碳源, 发酵条件同上。

最佳无机氮源的筛选: 在发酵培养基中分别加入 0.5% 的尿素、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{NH}_4\text{NO}_3$ 、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  作为无机氮源, 同时加入相应的最佳碳源和最佳有机氮源, 发酵条件同上。

最佳无机盐筛选: 在发酵培养基中分别加入 0.3% 的  $\text{MgSO}_4$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、 $\text{CaCO}_3$  作为无机盐, 同时加入相应的最佳碳氮源, 发酵条件同上。

(2) 正交试验 根据单因子试验结果, 选取有利于菌体生长的碳源、有机氮源、无机氮源和无机盐进行正交试验。

确定最佳组合后, 接种 0.2% 种子液, 37  $^{\circ}\text{C}$ , 190 r/min, 培养 24 h, 采用稀释涂布平板法进行菌落计数。

## 2 结果与分析

### 2.1 溶磷菌的筛选

从土壤样品中共分离得到 15 个具有溶磷功能的细菌分离物。选择溶磷能力较好的一株细菌分离物标记为 JP6。JP6 的溶磷圈直径  $D$  为 13 mm, 菌落直径  $d$  为 5.0 mm, 溶磷比  $D/d$  为 2.6。JP6 在无机磷培养基上的效果图见图 1。

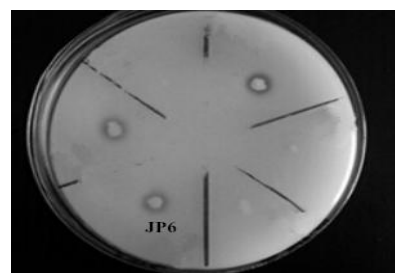


图 1 JP6 在无机磷培养基上的溶磷圈  
Fig.1 Phosphorus solubilizing halo of JP6 on inorganic phosphorus medium

### 2.2 功能测定

溶磷能力测定: 利用钼锑抗比色法对 JP6 菌株的溶磷能力进行定量测定, 测得 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d 的发酵液中的有效磷含量达到 50.1 mg/L。

产 IAA 能力测定: 经 Salkowski 显色方法测得 JP6 菌株 28  $^{\circ}\text{C}$  在 R<sub>2</sub>A 培养基中培养 4 d 的发酵液中的 IAA 含量达到 128.9  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.3 JP6 菌株鉴定

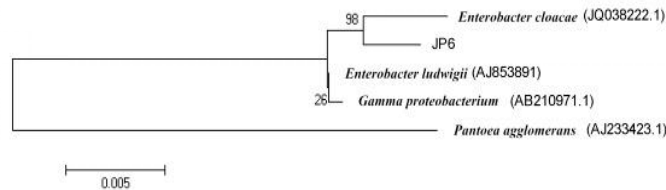
**2.3.1 生理生化实验** JP6 的菌体为短杆状, 菌体长为 6.5~8.7  $\mu\text{m}$ 。经革兰氏染色发现 JP6 菌株为革兰氏阴性菌。JP6 在 LB 固体培养基上的菌落特征为: 圆形, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润, 凸起, 易于挑取。JP6 的部分生理生化指标见表 1。JP6 与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) 模式种的生理生

化具有相同特征, 由各项生理生化推断JP6 可能为阴沟肠杆菌。

**表 1 生理生化检测**  
**Table 1 Physiological and biochemical test**

检测项目	阴沟肠杆菌	JP6	检测项目	阴沟肠杆菌	JP6
Examining items	<i>Enterobacter cloacae</i>	JP6	Examining items	<i>Enterobacter cloacae</i>	JP6
脲酶	d	+	ONPG	+	+
V-P 试验	+	+	卫矛醇	(-)	-
吲哚产生	-	-	乳糖利用	+	+
甲基红试验	-	-	七叶苷利用	d	+
柠檬酸盐利用	+	+	山梨醇利用	+	+
赖氨酸脱羧酶	-	-	麦芽糖利用	+	+
鸟氨酸脱羧酶	+	+	鼠李糖利用	+	+
葡萄糖发酵产气	+	+	棉籽糖利用	+	+
葡萄糖发酵产酸	+	+			

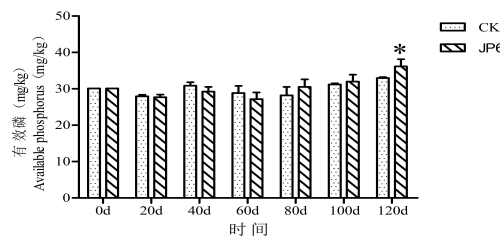
2.3.2 16s rRNA 鉴定



**图 2 JP6 系统发育树**  
**Fig.2 Phylogenetic tree of JP6**

对 16S rRNA 序列进行测序后, 将序列提交至 GenBank 中, 获得序列号 (KU160628), 在 NCBI 中进行 BLAST 比对发现 JP6 菌株的 16S rRNA 序列与阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) (JQ038222.1) 相似度为 99%。由图 2 系统发育树可以看出 JP6 菌株与阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) (JQ038222.1) 同处最小的一个分支, 进化距离较近, 综合生理生化指标将 JP6 菌株鉴定为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。

2.4 模拟条件下 JP6 对土壤有效磷释放的影响



**图 3 有效磷含量随天数变化**  
**Fig.3 Phosphorus content changes with the days**

注: “\*”代表在 0.05 水平上存在显著差异  
Note: “\*” indicates significant difference ( $P < 0.05$ ) among different treatments.

对照组 CK 和 JP6 组的模拟试验结果 (图 3) 显示: 与初始土壤相比, 前 60 d 土壤中的有效磷含量减少。60 d 以后 CK 和 JP6 组的有效磷含量开始增加。其中 CK 组的土壤有效磷含量增加缓慢, JP6 处理组在 80 d 时土壤有效磷含量高于 CK, 并且超过初始值。CK 组在 100 d 和 120 d 时有效磷含量也高于初始值。与对照相比, JP6 组 80 d、100 d 的有效磷含量分别增加 2.16%、2.59%; 120 d 时, JP6 组土壤中的有效磷含量在 0.05 水平上显著高于 CK 组, 与 CK 相比, JP6 的有效磷含量增加 9.84%。

2.5 培养基优化

2.5.1 单因子试验

**表 2 碳源的优化**  
**Table 2 Optimization of carbon source**

指标	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	蔗糖	可溶性淀粉	玉米粉
Index	Glucose	Lactose	Maltose	Sucrose	Soluble starch	Corn flour
OD <sub>600</sub>	1.206	1.125	0.584	0.746	0.180	0.560

根据发酵液在 600 nm 处的吸光度值可以对细菌生长量做一个初步判断。表 2 显示不同碳源的 OD<sub>600</sub> 值大小为葡萄糖 > 乳糖 > 蔗糖 > 麦芽糖 > 玉米粉 > 可溶性淀粉, 所以 JP6 的最佳碳源为葡萄糖。

表 3 氮源优化

Table 3 Optimization for nitrogen source

指标 Index	有机氮源 Organic nitrogen source			指标 Index	无机氮源 Inorganic nitrogen source			
	蛋白胨	酵母粉	豆粕		NH <sub>4</sub> Cl	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	尿素
OD <sub>600</sub>	1.255	1.327	1.308	OD <sub>600</sub>	1.138	0.631	0.591	0.627

发酵 15 h 后对发酵液进行 OD<sub>600</sub> 的测定, 3 种有机氮源的 OD<sub>600</sub> 值大小为: 酵母粉>豆粕>蛋白胨, 确定 JP6 的最佳有机氮源为酵母粉。由于 JP6 在酵母粉和豆饼粉中的生长量相差不大, 同时考虑到生产成本, 所以选择豆粕作为最佳有机氮源。

在无机氮源的选择中发现 NH<sub>4</sub>Cl 的 OD<sub>600</sub> 值要高于 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、尿素、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 故此确定 JP6 的最佳无机氮源为 NH<sub>4</sub>Cl。

表 4 无机盐优化

Table 4 Optimization of inorganic salt

指标 Index	MgSO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	CaCO <sub>3</sub>
OD <sub>600</sub>	0.764	1.157	0.964	1.287

在确定最佳碳源和氮源的基础上对无机盐进行优化, 在豆芽汁培养基中分别加入 0.3% 的 MgSO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>。对 OD<sub>600</sub> 的值进行比较, 发现 CaCO<sub>3</sub>>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>>MgSO<sub>4</sub>。由此可以看出 JP6 的最佳无机盐为 CaCO<sub>3</sub>。

2.5.2 正交试验 根据单因子试验确定的最佳碳源、有机氮源、无机氮源和无机盐, 选取葡萄糖 (A), 豆粕 (B), NH<sub>4</sub>Cl (C), CaCO<sub>3</sub> (D) 进行 4 因素 3 水平正交试验, 试验设计如表 5 所示。

表 5 正交试验设计

Table 5 Orthogonal experimental design

水平 Level	葡萄糖 (A) % Glucose	豆粕 (B) % Soybean meal	NH <sub>4</sub> Cl (C) %	CaCO <sub>3</sub> (D) %
1	2.0	3.0	0.5	0.5
2	1.5	2.0	0.3	0.3
3	1.0	1.0	0.1	0.1

表 6 正交试验结果

Table 6 The results of orthogonal experiment

试验号 Test number	因素 Factor				OD <sub>600</sub>
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	1.454
2	1	2	2	2	1.365
3	1	3	3	3	1.259
4	2	1	2	3	1.435
5	2	2	3	1	1.458
6	2	3	1	2	1.523
7	3	1	3	2	0.973
8	3	2	1	3	1.500
9	3	3	2	1	1.095
k1	1.360	1.287	1.492	1.336	
k2	1.472	1.441	1.298	1.287	
k3	1.189	1.292	1.23	1.065	
R	0.283	0.154	0.262	0.271	

对正交试验结果进行极差分析可以得出四种因素的极差值大小排列为 R<sub>A</sub>>R<sub>D</sub>>R<sub>C</sub>>R<sub>B</sub> (见表 6), 可以判断影响发酵液中 JP6 菌体数量的主要因素是葡萄糖 (A), 其次为 CaCO<sub>3</sub> (D) 和 NH<sub>4</sub>Cl (C), 豆粕 (B) 影响最小。

根据正交试验所得的 K 值大小可以确定 JP6 的最佳培养基为在 10% 黄豆芽基础上添加 1.5% 葡萄糖, 2% 豆粕, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 0.5% CaCO<sub>3</sub>。利用最佳培养基, 0.2% 接种量, 37 °C, 190 r/min, 培养 24 h, 发酵液中 JP6 活菌数达到 7.55×10<sup>9</sup> cfu/mL, 而在初始发酵培养基中活菌数为 5.92×10<sup>8</sup> cfu/mL, 活菌数大幅度增加。

### 3 讨论

本试验从取自湖南官地坪烟科所烟田的烟草根际土壤中分离筛选得到 JP6 菌株。经形态和生理生化鉴定, 以及 16S rRNA 测序将 JP6 鉴定为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*)。JP6 菌株发酵液中的有效磷含量达到 50.1 mg/L, 发酵液中的 IAA 含量达到 128.9 μg/mL。固体培养时, JP6 菌株的溶磷比为 2.6, 而李明新报道的阴沟肠杆菌 C-12<sup>[18]</sup>的溶磷比为 2.0。C-12 发酵液中有有效磷含量为 210.6

mg/L, 而 JP6 的发酵液中有有效磷含量为 50.1 mg/L, 这是由接种量不同导致的, 试验中 C-12 进行液体培养时接种量为 4%, JP6 进行液体培养时接种量为 1%。与李晓举<sup>[17]</sup>、李明新<sup>[18]</sup>报道的阴沟肠杆菌相比, JP6 还兼有产生长素功能。在土壤模拟试验中发现土壤中有有效磷含量在前期出现降低的现象, 可能原因是土壤进行自然风干处理, 未进行彻底灭菌, 当土壤的水分、培养温度适宜时土壤微生物的休眠体(如芽孢)萌发, 而休眠体萌发过程需要消耗土壤中的磷素, 用于合成细胞结构, 前期出现下降。随着试验时间的延长, CK 组的土壤有效磷含量出现增加的现象, 可能是因为土壤中存在的具有溶磷作用的微生物如芽孢杆菌会发挥溶磷功能<sup>[24]</sup>, 能够降解土壤中的难溶磷, 引起土壤中有有效磷含量的增加。JP6 组的土壤有效磷含量在整个试验过程中与 CK 组变化趋势一致, 但前 60 d 有效磷含量低于 CK 组, 可能原因是接种 JP6 菌剂后, 土壤中微生物的含量短时间内大量增加, 微生物为维持生命活动消耗大量可溶性磷素, 因此 JP6 土壤中有有效磷含量比 CK 减少幅度大。在 80 d 后 JP6 组的土壤有效磷含量高于对照, 推测原因是 JP6 具有溶磷功能, 接种 JP6 后, 经过一段时间适应土壤环境, 开始加速土壤中难溶磷的分解。在 120 d 时, JP6 组的有效磷含量与 CK 在 0.05 水平达到显著差异, 增加 9.84%。

## 4 结论

本试验筛选出兼有溶磷和产生长素功能的阴沟肠杆菌 JP6 菌株, 通过模拟试验验证 JP6 在土壤中具有较好的溶磷作用, 试验中运用单因子试验和正交试验两种方法对 JP6 的液体摇瓶发酵培养基进行优化。优化后的最佳培养基是在 10% 黄豆芽基础上添加 1.5% 葡萄糖, 2% 豆粕, 0.5% NH<sub>4</sub>Cl, 0.5% CaCO<sub>3</sub>。利用稀释涂布平板法计数, 发现优化后的培养基能有效促进阴沟肠杆菌 JP6 菌株的生长, 为阴沟肠杆菌 JP6 菌株下一步的实验室培养、工业化生产以及农业生产应用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 司辉, 孙敬国, 闫铁军, 等. 肥料对烤烟产量和品质影响的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(31): 13713-13715, 13719
- [2] 张岁岐, 山仓, 赵丽英. 土壤干旱下氮磷营养对玉米气体交换的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2002, 8(3): 271-275
- [3] 潘建刚, 常亚, 高国日, 等. 无机解磷菌的分离鉴定及解磷条件优化[J]. 广东农业科学, 2015(6): 56-59
- [4] Behera BC, Singdevsachan SK, Mishra RR, et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove—A review[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(2): 97-110
- [5] 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
- [6] 王岳坤, 于飞, 唐朝荣. 海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 64-71
- [7] 郑国华, 王金昌, 王小红. 植物根际细菌的促生机制[J]. 江西科学, 2012, 30(4): 454-458
- [8] 占新华, 蒋延惠, 徐阳春, 等. 微生物制剂促进植物生长机理的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 1999, 5(2): 2-10
- [9] 王奎萍, 郑颖, 褚光耀, 等. 解磷、固氮、产吲哚乙酸微生物菌株的筛选及其对植物的促生效果[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(6): 1352-1359
- [10] 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
- [11] 黄达明, 李倩, 管国强, 等. 一株解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷培养条件的优化[J]. 生物技术通报, 2015, 31(2): 173-178
- [12] 黄雪娇, 王晗, 李振轮. 解磷微生物的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(19): 8083-8084, 8087
- [13] 刘盼, 赵华, 林广修, 等. 解磷菌的筛选及培养基成分对解磷能力的影响[J]. 天津科技大学学报, 2015, 30(6): 17-22
- [14] 史国英, 莫燕梅, 岑贞陆, 等. 一株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1271-1278
- [15] 陈倩, 刘善江, 白杨, 等. 山西矿区复垦土壤中解磷细菌的筛选及鉴定[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(6): 1505-1516
- [16] 陆瑞霞, 王小利, 李显刚, 等. 地八角根际溶磷菌溶磷能力及菌株特性研究[J]. 中国草地学报, 2012, 34(4): 101-108
- [17] 李晓举, 吴风光, 王豹祥, 等. 一株烤烟根际解磷细菌的鉴定及其在烤烟生产中的应用[J]. 河南农业科学, 2011, 40(6): 66-70
- [18] 李明新. 土壤中溶无机磷细菌的分离、鉴定及阴沟肠杆菌溶无机磷基因的克隆[D]. 北京: 中国农业科学院, 2005
- [19] 金术超, 杜春梅, 平文祥, 等. 解磷微生物的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2006, 26(2): 73-78
- [20] 林启美, 王华, 赵小蓉, 等. 一些细菌和真菌的解磷能力及其机理初探[J]. 微生物学通报, 2001, 28(2): 26-30
- [21] Glickmann E, Dessaux Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria[J]. Applied and environmental microbiology, 1995, 61(2): 793-796
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [23] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2013
- [24] 柯春亮, 陈宇丰, 周登博, 等. 香蕉根际土壤解磷细菌的筛选、鉴定及解磷能力[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 1032-1042