

吴晓青, 吕玉平, 周方园, 等. 设施农业土壤中聚磷菌的筛选及其生物学特性分析[J]. 农业环境科学学报, 2019, 38(8): 1704-1711.

WU Xiao-qing, LÜ Yu-ping, ZHOU Fang-yuan, et al. Isolation and biological characterization of phosphorus accumulating organisms (PAOs) from greenhouse facility soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2019, 38(8): 1704-1711.

设施农业土壤中聚磷菌的筛选及其生物学特性分析

吴晓青¹, 吕玉平², 周方园¹, 赵晓燕¹, 张广志¹, 任何³, 周红姿¹, 王加宁¹, 张新建^{1*}

(1. 齐鲁工业大学(山东省科学院)生态研究所, 山东省应用微生物重点实验室, 济南 250103; 2. 中国科学院上海植物逆境生物学研究中心, 上海 201600; 3. 山东新时代药业有限公司, 山东 临沂 273400)

摘要:为在设施农业土壤中筛选获得兼具高效除磷能力和良好环境适应性的聚磷菌(Phosphorus accumulating organisms, PAOs),从设施大棚采集40 cm以上土样,梯度稀释后经PAOs平板初筛、异染粒染色复筛聚磷菌,结合形态学和16S rRNA测序鉴定种属。采用钼锑抗分光光度计法测定聚磷菌的除磷率和菌体磷含量,PCR验证聚磷作用关键基因*ppk*。采用活菌计数法分析聚磷菌的耐盐和耐高温率,对峙培养法分析对病原菌的抑菌率。本研究共筛选得到7株聚磷菌,经鉴定分别属于节杆菌(*Arthrobacter* spp.)、微杆菌(*Microbacterium* spp.)、红球菌(*Rhodococcus* spp.)和芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)4个菌属。好氧条件下,所有菌株均具有除磷作用,其中*A. ureafaciens* Fp64的除磷率最高(70.52%),*R. rhodochrous* Fp31的菌体含磷量最高(18.74%)。在除磷率大于50%的4株聚磷菌中,均可扩增获得*ppk*基因。所筛选聚磷菌兼具多种其他生物学特性,其中*A. ureafaciens* Fp64和*A. keyseri* Fp38具有病原菌拮抗和耐盐性,*M. esteraromaticum* Np20具有病原菌拮抗和耐高温性,*R. rhodochrous* Fp31具有极其显著的耐盐性。本研究所筛选的菌株具有较高的除磷能力和菌体含磷量,兼具拮抗病原菌和良好环境适应性等特点,有望用于控制土壤渗漏磷流失,为进一步研发针对设施农业土壤环境的高效生物除磷技术提供了优良菌种。

关键词:聚磷菌;除磷;生物学特性;设施农业;土壤

中图分类号:S154.3 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2019)08-1704-08 doi:10.11654/jaes.2019-0535

Isolation and biological characterization of phosphorus accumulating organisms (PAOs) from greenhouse facility soil

WU Xiao-qing¹, LÜ Yu-ping², ZHOU Fang-yuan¹, ZHAO Xiao-yan¹, ZHANG Guang-zhi¹, REN He³, ZHOU Hong-zi¹, WANG Jia-ning¹, ZHANG Xin-jian^{1*}

(1. Shandong Provincial Key Laboratory of Applied Microbiology, Ecology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250103, China; 2. Shanghai Center for Plant Stress Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201600, China; 3. Shandong New Times Pharmaceutical Co., Ltd., Linyi 273400, China)

Abstract: The objective of this study was to isolate efficient phosphorus accumulating organisms (PAOs) with good environment adaptability. Soil samples (0-40 cm depth) were collected from within greenhouses. The PAOs were isolated and screened by serial dilution, PAO-plate culturing, and metachromatic granule staining. Taxonomic identification of PAO isolates was based on morphological characters and 16S rRNA sequencing. Phosphorus removal and phosphorus contents of these PAOs were determined by the Mo-Sb colorimetric method.

收稿日期:2019-05-14 录用日期:2019-06-27

作者简介:吴晓青(1983—),女,山东菏泽人,博士,助理研究员,从事应用微生物研究。E-mail: xq_wu2008@163.com

*通信作者:张新建 E-mail: zhangxj@sdas.org

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFD0800402);山东省重点研发计划项目(2017CXGC0223);中国科学院沈阳分院-山东省科学院青年科学家合作伙伴项目(第三批);枣庄英才聚集工程[2017]116号

Project supported: The National Key R&D Program of China (2017YFD0800402); The Key R&D Program of Shandong Province (2017CXGC0223); Young Scientists Partner Project between Shenyang Branch of Chinese Academy of Sciences and Shandong Academy of Sciences (3th); Talent Gathering Project of Zaozhuang[2017] No.116

Gene *ppk*, the key gene in phosphorus-accumulation, was amplified using PCR. Salt and high temperature tolerances were analyzed by counting the number of surviving bacteria following exposure. Antagonistic activity against pathogens was determined by a confrontation test. Seven bacterial PAOs belonging to 4 genera, *Arthrobacter*, *Microbacterium*, *Rhodococcus*, and *Bacillus* were screened. All strains showed phosphorus-removal effects, of which *A. ureafaciens* Fp64 showed the largest removal effect (70.52%), and *R. rhodochrous* Fp31 had the highest phosphorus content (18.74%). The *ppk* gene was detected in 4 strains with phosphorus removal rate >50%. The PAO strains also showed variable biological characters. *A. ureafaciens* Fp64 and *A. keyseri* Fp38 were salt tolerant and antagonistic to pathogens. *M. esteraromaticum* Np20 showed antagonistic activities and high temperature tolerance. *R. rhodochrous* Fp31 exhibited prominent salt tolerance. The PAO strains screened in this study had high phosphorus contents and phosphorus removal capacities. Furthermore, they exhibited variable features, including antagonistic activity and environmental adaptability. They are expected to be used to reduce phosphorus loss from soil leaching and act as good agents for biological phosphorus removal technology in the greenhouse industry.

Keywords: phosphorus accumulating organisms; phosphorus removal; biological characteristics; greenhouse facility; soil

磷素是植物生长中不可缺少的大量营养元素之一,磷素肥料也是农业生产中最普遍使用的肥料种类之一。为了适应市场需求,近年来我国设施农业产业发展迅速。2015年我国设施农业蔬菜产量已占蔬菜总产量的54%以上,面积、产量和产值都在不断扩大^[1]。在设施农业生产中,盲目大量施用磷肥的现象十分严重,磷肥施用量是蔬菜需肥量的5~20倍^[2-3],长期超量使用磷肥不仅在0~20 cm耕层中富集大量的磷,20~40 cm深层土壤中磷素积累量也在不断增加^[3]。不同含磷量土壤的渗漏液中可溶性磷浓度在0.5~5 mg·L⁻¹之间^[4],通过渗漏液流失的磷素易造成毗邻水体富营养化^[5],是农业面源污染的重要源头之一^[6],亟需进行除磷处理。目前除磷技术主要包括材料吸附法和生物除磷法。其中吸附法是通过添加矿物、聚合物、生物炭等材料,利用不同材料的吸附或改变无机磷形态的作用,达到除磷效果^[7]。而利用聚磷菌(Phosphate accumulating organisms, PAOs)等微生物好氧聚磷、无氧放磷特性的生物除磷技术已经在污水治理方面日趋成熟^[8-9]。聚磷菌聚磷与编码多聚磷酸盐激酶(PPK)的*ppk*基因直接相关,其表达的PPK可催化ATP上的磷酸基团连接形成多聚磷酸盐颗粒(Poly-P)^[10]。一些聚磷菌从土壤中分离获得,例如从磷化工厂周边土壤中分离的嗜麦芽寡营养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)^[11],从玉米根际土壤中分离的阿氏芽孢杆菌(*Bacillus aryabhatai*)^[12],从烟草秸秆处理厂土壤中分离的嗜线虫沙雷氏菌(*Serratia nematodiphila*)^[13]等。目前,从土壤中分离的聚磷菌主要应用于水体或污泥磷污染的处理,近期研究逐渐关注土壤聚磷菌对土壤磷素的调控作用。设施农业生产中盲目施肥导致过量的磷素渗漏污染地下水,亟需研发土壤磷素调控技术,但目前鲜见设施农业环境中聚磷菌的筛选。为了开发适用于设施农业环境的生

物除磷技术,本研究对设施蔬菜大棚土壤中的聚磷菌进行了分离筛选和鉴定,并测定了菌株的环境适应特性和对病原菌的拮抗能力。本研究获得的不同生物学特性的聚磷菌为进一步开发设施农业生物除磷技术提供了优良的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 样品采集

土壤样品采集自山东兰陵设施蔬菜大棚(117°57'12"E, 34°52'44"N),采样时间为2017年9月,采样深度为40 cm以内,土壤类型为褐土,pH 7.0~8.5。

1.2 聚磷菌的筛选

将土壤样品梯度稀释后涂布于PAOs平板进行聚磷菌的初步筛选^[14]。用无菌水将土壤分别稀释至10⁻¹、10⁻²、10⁻³,振荡30 min后静置30 min获得上清,即为梯度稀释液。分别吸取3个梯度稀释液1 mL置于9 cm培养皿中,与40℃左右的PAOs固体培养基[含柠檬酸钠4 g、NaCl 0.5 g、(NH₄)₂SO₄ 2.5 g、CaCl₂ 0.25 g、MgSO₄ 0.25 g、Na₂HPO₄ 12.8 g、KH₂PO₄ 3 g、麦芽糖0.01 g、甲苯胺蓝0.025 g、琼脂20 g,无需调节pH,115℃灭菌30 min]充分混合凝固,在28℃恒温培养箱中暗培养7~10 d。在PAOs平板上长出的菌落中挑选着色为紫红色的菌落,反复划线分离,直至平板上的单菌落形态一致,显微镜下大小形态也一致,即为初筛菌株。

采用异染粒染色法^[15]对初筛菌株进行复筛。在载玻片上涂布菌液,首先置于染色液I(甲苯胺蓝0.15 g和孔雀绿0.2 g溶于2 mL乙醇,再加入混合均匀的1 mL冰醋酸和100 mL蒸馏水)中染色5 min,再用染色液II(碘2 g和碘化钾3 g,共同溶于100 mL蒸馏水)冲去染色液I,继续染色1 min,在显微镜下镜检,其中异染粒被染成紫黑色,菌体为绿色。

1.3 菌体磷含量和除磷率的测定

挑选纯化后的单菌落接入到LB(含胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)培养液中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡暗培养过夜,活化菌株。将菌株发酵液以体积比1:100加入到低营养检测培养液^[16][含 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4 g 、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.002 g 、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.08 g 、 CH_3COONa 0.5 g 、牛肉膏 0.22 g 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2 g 、 KH_2PO_4 43.87 mg 、 $\text{dd}'\text{H}_2\text{O}$ 1 L ,用 $1.0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaOH调节pH至6.5]中,初始总磷质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡暗培养至对数期,以未接菌株的低营养培养液为对照。参考蔡天明等^[17]方法,以过硫酸钾消解菌体,按照总磷测定方法测菌体总磷量:

菌体磷含量=菌体总磷量/菌体干质量 $\times 100\%$ 。

将获得的培养物 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min ,取上清测定磷含量,计算除磷率:

除磷率=(对照总磷量-上清液总磷量)/对照总磷量 $\times 100\%$ 。

上述实验均设置3个生物学重复。采用钼锑抗比色法^[14]测定磷含量。测定5个浓度(1、3、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)磷标准液的吸光度,通过绘制标准曲线获得磷浓度和吸光度关系公式(图1),利用关系式计算待

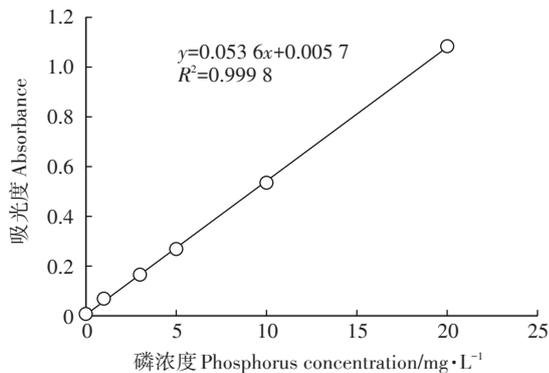


图1 磷浓度测定的标准曲线

Figure 1 Standard curve for determination of phosphorus concentration

测液中的磷含量。

1.4 菌株种属的分子鉴定

菌株活化后(同1.3),将菌液寄送至青岛擎科公司进行测序,测序基因为16S rRNA,引物分别为1492 R和27 F^[18]。将基因测序结果在Genbank中BLAST比对,采用MEGA-X对16S rRNA结果进行比对分析,采用Maximum Likelihood法绘制系统发育树。

1.5 多聚磷酸盐激酶基因(ppk)的PCR验证

针对两株节杆菌Fp64和Fp38,参考Genbank中节杆菌属ppk基因序列,利用Bioedit软件分析保守区,设计引物并进行PCR扩增。微杆菌Np20和红球菌Fp31分别参考Genbank中同种序列,设计引物进行PCR扩增。引物设计软件为Primer Premier 6.0,引物序列详见表1。PCR反应体系包括:2 \times Taq PCR Colorless Mix(鼎国) $25 \mu\text{L}$, DNA模板 $0.5 \mu\text{L}$, primer($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 $2 \mu\text{L}$, $\text{dd}'\text{H}_2\text{O}$ $20.5 \mu\text{L}$ 。PCR扩增条件: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min , $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s 、 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 或 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s 、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 1 min 20 s , 32个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 。PCR产物寄送至上海生工测序后,利用Bioedit软件进行序列同源性比对。

1.6 菌株的耐盐效果测定

菌株活化后(同1.3),将浓度统一调整至 $1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,以体积比1:100分别接种至NaCl终浓度为50、100、150 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的LB培养液中, $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 暗培养振荡28 h,以不添加NaCl的LB培养液为对照。从不同处理中分别取 $100 \mu\text{L}$ 培养物,均匀涂布在LB固体(含胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、NaCl $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、琼脂 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)培养平板上,在 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中暗培养48 h,统计单菌落数,计算耐盐率,本试验设3个生物学重复。计算公式:

耐盐率=处理菌数/对照菌数 $\times 100\%$ 。

1.7 菌株的耐高温效果测定

菌株活化后(同1.3),将浓度统一调整至 $1 \times 10^9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$,以体积比1:100接种至LB培养液中,分别在 $40 \text{ }^\circ\text{C}$ 和 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 下, $180 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 暗培养振荡28 h,以 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养条件为对照。从不同处理中分别取 $100 \mu\text{L}$

表1 ppk基因的引物信息

Table 1 Primer information of ppk genes

菌株编号 Strain name	引物序列 Sequence	扩增长度 Product length/bp	退火温度 Annealing temperature/ $^\circ\text{C}$
Fp64/Fp38	F 5'-AACCCGATCAGCGACAAAG-3' R 5'-TTGGCGAAGGCCGAACACCC-3'	1328	55
Np20	F 5'-GGTGAAGGTGCTGACCAT-3' R 5'-GCTGCCGATGTAGACGAT-3'	1309	50
Fp31	F 5'-TGAGCAATCCGACATCCT-3' R 5'-ACCTCGACGAGTTCTACAT-3'	1293	50

培养物,均匀涂布在LB固体培养平板上,在30℃恒温培养箱中暗培养48h,统计单菌落数,计算耐高温率,本试验设3个生物学重复。计算公式:

不同温度下耐高温率=处理菌数/对照菌数×100%。

1.8 菌株对病害的拮抗效果测定

菌株活化后(同1.3),将浓度统一调整至 1×10^9 CFU·mL⁻¹,取200 μL菌液至9 cm培养皿中,与40℃左右的PDA(BD, America)固体培养基充分混匀凝固。分别在培养平板中央接入直径为5 mm的病原菌菌块,分别为从病株分离的灰霉菌(*Botrytis* spp.)、腐霉菌(*Pythium* spp.)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia* spp.)和镰刀菌(*Fusarium* spp.),对照为各病原菌在PDA平板上单独培养。将上述平板置于25℃培养3~4 d,统计病原菌菌落直径,计算拮抗率,本试验设3个生物学重复。计算公式:

对不同病原菌的拮抗率=(对照直径-处理直径)/对照直径×100%

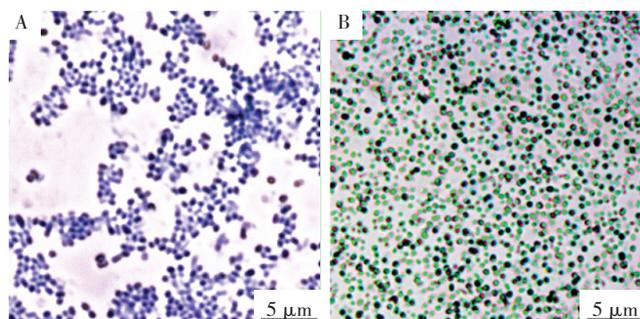
1.9 统计学分析方法

采用Excel 2016软件进行数据统计分析。采用SPSS 22.0软件,用Duncan法进行多组样本间差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 设施土壤聚磷菌的筛选

将采集自设施蔬菜大棚的土壤样品,通过PAOs平板筛选获得初筛单菌落,再根据其菌落、革兰氏染色等形态特征初步分为17类细菌。对筛选获得的17类细菌进行异染粒染色,显微镜检具有明显异染粒结



A. 革兰氏染色(呈革兰氏阳性); B. 异染粒染色(异染粒为紫黑色、菌体为绿色)

A. gram staining(positive); B. metachromatic granule staining (metachromatic granule was stained black-purple, while bacterial body was stained green)

图2 菌株Fp64的形态学观察

Figure 2 Morphological observation of the strain Fp64

构的菌株。复筛获得7株细菌(分别命名为Fp64、Fp31、Np20、Fp38、Bp13、Bp14和Bp12),均为革兰氏阳性菌并可观察到异染粒结构。图2所示为代表菌株Fp64的革兰氏染色和异染粒染色情况。

PCR扩增筛选菌株的16S rRNA后测序,并在Genbank中进行Blast比对,结果表明上述7株菌分别属于节杆菌(*Arthrobacter* spp.)、芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、红球菌(*Rhodococcus* spp.)和微杆菌(*Microbacterium* spp.)4个属的6个不同种,系统发育树如图3所示。经Bioedit软件进行序列同源性比对分析,Fp64与*A. ureafaciens* FN433020.1的16S rRNA同源性为98.8%,Fp38与*A. keyseri* JF703649.1的同源性为100%,Bp12和Bp13与*B. subtilis* MF196314.1的同源性分别为99.0%和97.1%,Bp14与*B. methlotrophicus* KC172004.1的同源性为99.0%,Fp31与*R. rhodochrous* KP-25713.1的同源性为99.9%,以及Np20与*M. esteraromaticum* JN082268.1的同源性为100%。

2.2 聚磷菌的除磷作用分析

利用钼锑抗比色法检测了上述7株聚磷菌的除磷作用。结果表明,培养至对数期时,除磷率最高的菌株为节杆菌Fp64(70.52%),其次高于50%的依次为红球菌Fp31(64.34%)、微杆菌Np20(61.39%)和节杆菌Fp38(56.30%),3株芽孢杆菌Bp13、Bp14和Bp12的除磷率均低于50%(图4A)。可以看出,在好氧条件下,筛选获得的聚磷菌均有除磷效果,其中节杆菌、红球菌和微杆菌菌株的除磷率比芽孢杆菌菌株的高。另检测了对数期菌体中的磷含量(磷占菌体干质量的百分比)。结果表明,Fp31的菌体磷含量最高为18.74%,另外Fp64、Np20和Fp38的菌体磷含量分别为17.89%、15.87%和13.69%,均高于10%,其余

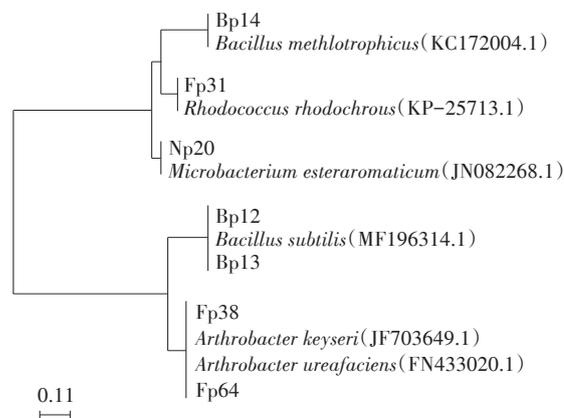


图3 菌株系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of screened strains

Bp14、Bp13和Bp12的菌体磷含量均低于10% (图4B)。上述结果表明所筛选聚磷菌中,节杆菌、红球菌和微杆菌的聚磷效果和除磷作用显著高于芽孢杆菌。

对筛选获得的除磷率在50%以上的4株菌Fp64、Fp31、Np20和Fp38进行了 ppk 基因的PCR验证(图5)和DNA测序。本研究筛选的节杆菌*A. ureafaciens* Fp64和*A. keyseri* Fp38两个种在Genbank中没有 ppk 基因登记,通过比对同属 ppk 基因保守序列,设计引物,PCR扩增获得的序列与*Arthrobacter* sp. ATCC21022的 ppk 基因同源性分别为99.30%和99.20%。根据同种已登记的 ppk 基因设计引物,PCR扩增获得的Np20

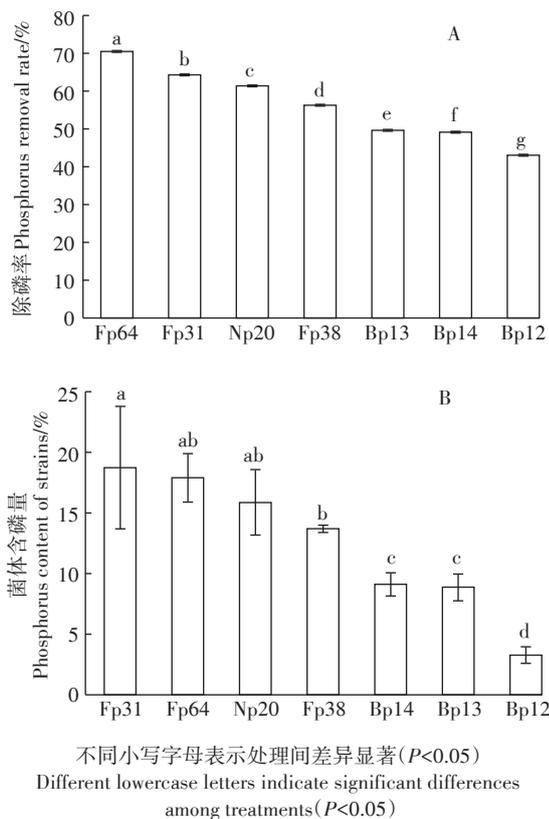


图4 聚磷菌的除磷效果分析

Figure 4 Phosphorus removal efficiencies of the screened PAOs

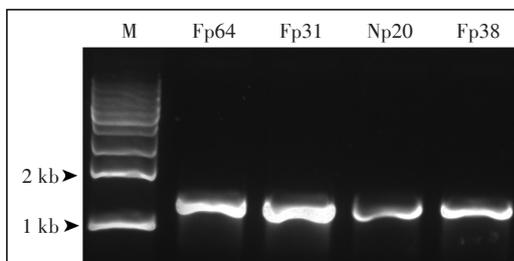


图5 4株聚磷菌 ppk 基因片段的PCR产物

Figure 5 PCR product of ppk gene fragment of 4 strains

序列与*M. esteraromaticum* DSM8609的 ppk 基因同源性为99.70%,Fp31序列与*R. rhodochrous* NCTC630的 ppk 基因同源性为99.50%。结果表明,本研究筛选的聚磷菌基因组中均具有可催化产生Poly-P的 ppk 基因,从基因水平验证了4株菌的聚磷作用。

2.3 聚磷菌的其他特性分析

许多设施农业生产中存在积盐、高温和病害高发等不良生长条件,为了检测所筛选菌株在应用中的环境适应性,分别对其中除磷率大于50%的4株菌Fp64、Fp31、Np20和Fp38的耐盐、耐高温和对常见病原菌的拮抗能力进行了分析。

结果表明,4株菌均具有一定的耐盐性,但水平高低不同。其中红球菌Fp31的耐盐能力最为显著,在 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的NaCl条件下其生长不仅未被胁迫,反而菌数大幅提高(分别提高到4.88倍和3.07倍),在盐浓度高达 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,菌数仍可达对照的42.03%,其他3株菌则被严重抑制。两株节杆菌Fp64和Fp38在 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl条件下菌数未受显著影响,Fp64还可耐受 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐浓度,但同样浓度下Fp38的菌数仅为对照的69.69%。微杆菌Np20的耐盐水平较差,在 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐胁迫下菌数已降至对照的59.10%(图6A)。

在 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 高温条件下,4株菌的生长均受到抑制,其中微杆菌Np20和红球菌Fp31的耐受性较好,分别为44.15%和32.04%,而两株节杆菌Fp64和Fp31几乎被高温完全抑制(图6B)。

两株节杆菌Fp64和Fp31对4种病原真菌均具有较强的抑制作用,其中对腐霉菌均可100%抑制,对镰刀菌的抑菌率分别为86.99%和78.57%,对灰霉菌和立枯丝核菌的抑菌率也在50%~70%。微杆菌Np20也可完全抑制腐霉菌生长,对镰刀菌和灰霉菌的抑制率在60%以上,但对立枯丝核菌的抑制率低于10%。红球菌Fp31对4种病原真菌的抑制能力较差,对腐霉菌无抑制作用,对其他病原菌的抑制率均在20%以下(图6C)。结果表明,4株聚磷菌具有不同的生物学特性,其中红球菌的耐盐性较强,两株节杆菌的病原菌拮抗性、耐盐性较好,微杆菌比较耐高温。

3 讨论

本研究对设施蔬菜大棚土壤中的聚磷菌进行了分离、筛选和鉴定,共获得属于节杆菌、红球菌、微杆菌和芽孢杆菌4个属的7株菌。刘茵^[9]从东北玉米主产区的黑土、白浆土和黑钙土中分离得到的聚磷菌除

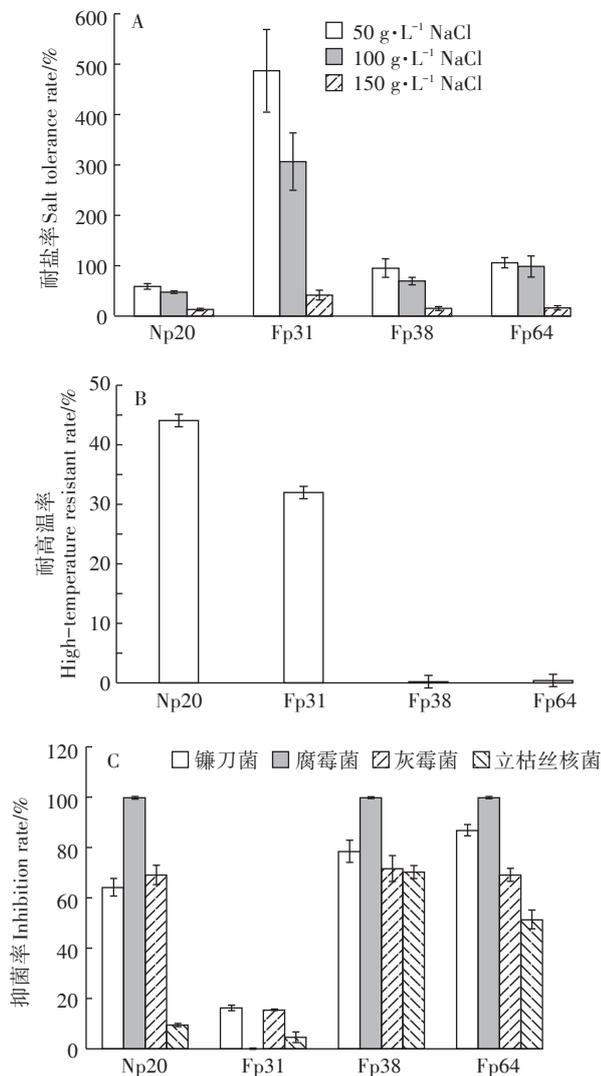


图6 聚磷菌的生物特性检测

Figure 6 Biological characters of PAO strains

了节杆菌、芽孢杆菌属外,还有不动杆菌(*Acinetobacter* spp.)、气单胞菌(*Aeromonas* spp.)、棒杆菌(*Corynebacterium* spp.)等10个属的细菌以及少数放线菌和真菌。Li等^[19]从玉米根际土中分离得到的高效聚磷菌PA09经鉴定为烟草节杆菌(*A. nicotinae*)。另外费氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)^[17]和嗜线虫沙雷氏菌(*Serratianem atodiphila*)^[13]也是自土壤中分离得到的高效聚磷菌。闫海啸等^[20]发现农田黑土中具有除磷功能的细菌种属显著高于污水处理厂活性污泥中筛选的聚磷菌。上述研究表明,不同类型的土壤中定殖着各种具有除磷功能的聚磷菌,本研究从设施蔬菜土壤中筛选获得的节杆菌、红球菌和微杆菌的除磷效果较好,其中红球菌和微杆菌是首次从土壤中筛选得到的被证明有除磷作用的聚磷菌。无论从水体污

泥还是土壤中获得聚磷菌,大部分用于外部水体磷污染的治理^[8,21-24],而鲜见针对设施农业土壤环境进行的聚磷菌筛选,本研究从设施大棚土壤中筛选聚磷菌,可利用其好氧摄磷的特性将磷固定在菌体中。初始总磷浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时最高可去除70.52%的磷,共有4株菌高于50%,而土壤渗滤液中的可溶性磷一般在 $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下^[4]。据相关报道,高磷浓度下筛选获得的聚磷菌可充分满足较低浓度磷污染的修复^[25-26],故而本研究所筛选菌株可满足土壤渗滤液除磷。所筛选聚磷菌的菌体含磷量最高为18.74%,共有4株菌高于10%,参考前人研究^[17],所筛菌株的聚磷能力较强。其中节杆菌Fp64的菌体含磷量略低于红球菌Fp31,但同样在对数时期,前者的除磷效果却显著高于后者。由于菌体含磷量与菌体质量负相关,而除磷率与菌数正相关。因此,在单菌细胞吸收磷素水平差异较小时,可能出现菌体含磷量较低但除磷率较高的情况。另外,本文通过PCR验证了4株聚磷菌中均存在*ppk*基因,但该基因在聚磷作用中的表达水平未经验证,需要进一步揭示其作用机制。

为了解所筛选的聚磷菌对设施农业环境的适应性,本研究还考察了聚磷菌的耐高温、耐盐和对病原菌的抑制率,结果表明不同属的聚磷菌呈现不同的生物学特性。其中两株节杆菌Fp64和Fp38对真菌病原菌均具有高效抑制作用,并可耐受 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的盐浓度,前人研究中节杆菌属菌株具有病原菌拮抗作用^[27-30],也具有耐盐特性^[31]。另有研究表明产脲节杆菌(*A. ureafaciens*)还具有对一种毒性农药阿特拉津的降解作用^[32-33],因此节杆菌在设施农业中具有多功能的应用潜力。除了节杆菌之外,本研究中微杆菌Np20对病原菌也具有一定的拮抗作用,且耐高温性较好,而红球菌Fp31较耐高温、对病原菌拮抗作用不明显,但具有显著耐盐性。另外,节杆菌、微杆菌、红球菌和芽孢杆菌属均曾报道为促生植物生长根际细菌(PGPR)^[34-35],本文中聚磷菌是否兼具促生作用还有待进一步验证。在接下来的研究中,我们将分析各菌株在土壤中施用后调节土壤渗滤液磷含量的效应,以及控制磷流失的能力,并利用其生物学特性优势,针对不同土壤环境条件配伍复合菌剂。

4 结论

(1)本研究从设施蔬菜大棚土壤中筛选出7株聚磷菌,经鉴定属于节杆菌、微杆菌、红球菌和芽孢杆菌4个属。

(2)好氧条件下,所有菌株均具有除磷作用,其中Fp64的除磷效果最显著(70.52%),Fp31的菌体含磷量最高(18.74%)。在除磷率>50%的4株聚磷菌中,均可扩增出*ppk*基因。

(3)所筛选的聚磷菌兼具多种其他生物学特性,其中Fp64和Fp38具有病原菌拮抗和耐盐性,Np20具有病原菌拮抗和耐高温性,Fp31具有极其显著的耐盐性。

(4)本研究所筛选的菌株具有较高的除磷能力和菌体含磷量,兼具拮抗病原菌和良好环境适应性等特点,有望用于控制土壤渗漏液磷流失,为进一步研发针对设施农业土壤环境的高效生物除磷技术提供了优良菌种。

参考文献:

- [1]董静,赵志伟,梁斌,等.我国设施蔬菜产业发展现状[J].中国园艺文摘,2017,33(1):75-77.
DONG Jing, ZHAO Zhi-wei, LIANG Bin, et al. The development status of China's facility vegetable industry[J]. *Chinese Horticulture Abstract*, 2017, 33(1):75-77.
- [2]唐珧,李丽君,白光洁,等.山西南部设施蔬菜施肥及土壤氮磷累积现状调查分析[J].山西农业科学,2017,45(5):773-776,785.
TANG Yao, LI Li-jun, BAI Guang-jie, et al. Investigation and analysis on the current status of fertilization and soil nitrogen and phosphorus accumulation in greenhouse vegetable in southern of Shanxi[J]. *Journal of Shanxi Agriculture Sciences*, 2017, 45(5):773-776, 785.
- [3]魏玉奎,李新平,刘瑞丰,等.设施农业土壤磷素富集的动态变化[J].干旱地区农业研究,2011,29(1):126-132.
WEI Yu-kui, LI Xin-ping, LIU Rui-feng, et al. Dynamic changes of phosphorus enrichment in facility agricultural soil[J]. *Agricultural Research in the Arid Areas*, 2011, 29(1):126-132.
- [4]张作新,刘建玲,廖文华,等.磷肥和有机肥对不同磷水平土壤磷渗漏影响研究[J].农业环境科学学报,2009,28(4):729-735.
ZHANG Zuo-xin, LIU Jian-ling, LIAO Wen-hua, et al. The effect of phosphate fertilizer and manure on phosphorus leaching in different phosphorus levels soil[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(4):729-735.
- [5]金晶,高扬,王洋,等.土-水界面磷的稳定性与生物有效性对水体富营养化的影响[J].绿色科技,2018,4:60-65.
JIN Jing, GAO Yang, WANG Yang, et al. Phosphorus stability, transformation in soil-water layer and associated impact on water eutrophication[J]. *Journal of Green Science & Technology*, 2018, 4:60-65.
- [6]Lou H, Yang S, Zhao C, et al. Using a nitrogen-phosphorus ratio to identify phosphorus risk factors and their spatial heterogeneity in an intensive agricultural area[J]. *Catena*, 2017, 149:426-436.
- [7]杨栋,陈航,华玉妹,等.不同材料对河岸带土壤吸附除磷的强化能力及机制[J].环境工程,2018,36(2):74-77,119.
YANG Dong, CHEN Hang, HUA Yu-mei, et al. Improvement of three materials on phosphorus removal by riparian soil and the mechanism[J]. *Environmental Engineering*, 2018, 36(2):74-77, 119.
- [8]Yang Y, Shi X, Ballent W, et al. Biological phosphorus recovery: review of current progress and future needs[J]. *Water environment research: A Research Publication of the Water Environment Federation*, 2017, 89(12):2122-2135.
- [9]刘 蕊.土壤中聚磷菌的聚磷特性研究[D].长春:吉林农业大学,2013.
LIU Han. Study on phosphorus accumulation characteristics of poly-phosphorus bacteria in soil[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2013.
- [10]南亚萍,周国标,袁林江.多聚磷酸盐激酶基因在污水生物除磷中的功能[J].环境科学,2017,38(4):1529-1535.
NAN Ya-ping, ZHOU Guo-biao, YUAN Lin-jiang. Function of poly-phosphate kinase gene in biological phosphate removal during the wastewater treatment process[J]. *Environmental Science*, 2017, 38(4):1529-1535.
- [11]邵 闯,袁淑博,陈晓通,等.一株高效聚磷菌的筛选鉴定及基因组分析[J].湖北大学学报(自然科学版),2018,40(5):452-456.
SHAO Chuang, YUAN Shu-bo, CHEN Xiao-tong, et al. Screening and identification and genomic analysis of a high-efficient polyphosphate accumulating organisms[J]. *Journal of Hubei University(Natural Science Edition)*, 2018, 40(5):452-456.
- [12]王呈玉,萧龙珍,都郁馨.兼具康抗病促生活性的溶磷聚磷菌XF1的分离、鉴定与特性分析[J].吉林农大大学学报,2018,40(3):290-298.
WANG Cheng-yu, XIAO Long-zhen, DU Yu-xin. Isolation, identification and characteristic analysis of a phosphorus solubilizing and phosphorus accumulating bacterium XF1 with disease resistance and growth promoting activity[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2018, 40(3):290-298.
- [13]孙明辉,孙会忠,王小东,等.一株兼有 β -甘露聚糖酶活性聚磷菌的分离和鉴定[J].中国烟草科学,2016,37(2):23-28.
SUN Ming-hui, SUN Hui-zhong, WANG Xiao-dong, et al. Isolation and identification of a phosphate accumulating strain with β -mannanase activity[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2016, 37(2):23-28.
- [14]邱 旭.聚磷菌对矿物和黑土中不同形态磷素转化的作用研究[D].长春:吉林农业大学,2016.
QIU Xu. Study PAOs of different forms of phosphorus transformation in the role of minerals and black soil[D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2016.
- [15]Suresh N, Warburg R, Timmerman M. New strategies for the isolation of microorganisms responsible for phosphate accumulation[J]. *Waterence & Technology*, 2011, 17(11):99-111.
- [16]李海峰,李志建,屈建航.高效聚磷鞘氨醇杆菌XF-5的分离与鉴定[J].河南农业科学,2012,41(9):68-72.
LI Hai-feng, LI Zhi-jian, QU Jian-hang. Isolation and identification of a high-efficient phosphate accumulating *Novosphingobium* sp. Strain XF-5[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2012, 41(9):68-72.
- [17]蔡天明,管莉波,崔中利,等.高效聚磷菌株GM1的分离和聚磷特

- 性研究[J]. 土壤学报, 2005, 42(4):635-641.
- CAI Tian-ming, GUAN Li-bo, CUI Zhong-li, et al. Isolation and characterization of strain GM1 with high capability of accumulating Poly-P[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2005, 42(4):635-641.
- [18] Moreno C, Romero J, Espejo R T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. *Microbiology*, 2002, 148(4):1233-1239.
- [19] Li X, Yuan H, Yang J, et al. Genome sequence of the polyphosphate-accumulating organism *Arthrobacter* sp. strain PAO19 isolated from maize rhizosphere soil[J]. *Genome Announc*, 2013, 1(4):e00566-13.
- [20] 闫海嘯, 崔俊涛, 田立生, 等. 农田黑土中聚磷菌的筛选及其聚磷特性研究[C]//中国水土保持学会2012学术年会, 2012:281-283.
- YAN Hai-xiao, CUI Jun-tao, TIAN Li-sheng, et al. Screening of phosphorus accumulating organisms from black soil and their characteristics of phosphorus accumulation[C]//Chinese Society of Soil and Water Conservation(2012), 2012:281-283.
- [21] Xu G, Wang H, Gu J, et al. A novel A-B process for enhanced biological nutrient removal in municipal wastewater reclamation[J]. *Chemosphere*, 2017, 189:39-45.
- [22] Tarayre C, Charlier R, Delepierre A, et al. Looking for phosphate-accumulating bacteria in activated sludge processes: A multidisciplinary approach[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(9):8017-8032.
- [23] 魏儒平, 闫 诚, 杨欣妍, 等. 强化生物除磷系统的功能微生物研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10):1-8.
- WEI Ru-ping, YAN Cheng, YANG Xin-yan, et al. Research progress on the functional microorganisms in enhanced biological phosphorus removal(EBPR) systems[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(10):1-8.
- [24] Li H F, Zhang J H, Xin W L, et al. Full-scale application of microbial agent on in-situ sludge reduction[J]. *Journal of Southeast University (English Edition)*, 2016, 32(4):502-507.
- [25] 聂毅磊, 贾 纬, 曾艳兵, 等. 两株好氧反硝化聚磷菌的筛选、鉴定及水质净化研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(3):116-121.
- NIE Yi-lei, JIA Wei, ZENG Yan-bing, et al. Screening and identification of two aerobic denitrifying phosphorus-accumulating strains, and denitrifying biological phosphorus removal[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(3):116-121.
- [26] 陈亚松, 金文标, 闫 韞, 等. 高效聚磷菌的筛选及其应用[J]. 净水技术, 2011, 30(2):19-22.
- CHEN Ya-song, JIN Wen-biao, YAN Wen, et al. Screening and application of high efficient phosphate-accumulating organisms (PAOs) [J]. *Water Purification Technology*, 2011, 30(2):19-22.
- [27] 蔡 丽, 欧燕清, 陈巧儿, 等. 岭头单丛茶树内生细菌的分离与拮抗细菌鉴定[J]. 食品科技, 2016, 41(4):24-28, 34.
- CAI Li, OU Yan-qing, CHEN Qiao-er, et al. Isolation of endophytic bacteria from Lingtou Dancong tea tree and identification of antagonistic bacteria[J]. *Food Science and Technology*, 2016, 41(4):24-28, 34.
- [28] 彭玉娇, 李敬龙, 林学政. 极地抗植物病原真菌活性菌株 PKS 和 NRPS 基因的克隆与分析[J]. 海洋科学进展, 2014, 32(3):396-404.
- PENG Yu-jiao, LI Jing-long, LIN Xue-zheng. Cloning and analysis of PKS and NRPS genes from polar bacteria with antifungal activity against plant pathogenic fungi[J]. *Advances in Marine Science*, 2014, 32(3):396-404.
- [29] 时 健. 番茄根际灰霉病拮抗菌的筛选和遗传多样性研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2013.
- SHI Jian. Screening and genetic diversity of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea* isolated from tomato rhizosphere[D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2013.
- [30] 孙占斌, 袁行方, 吴雷飞, 等. 黄瓜可培养内生细菌抗病株的筛选与鉴定[J]. 重庆理工大学学报, 2012, 26(9):25-30.
- SUN Zhan-bin, YUAN Xing-fang, WU Lei-fei, et al. Screening and identification of culturable antagonistic endophytic bacteria from cucumber[J]. *Journal of Chongqing University of Technology (Natural Science)*, 2012, 26(9):25-30.
- [31] 马文花, 吴 越, 李进胜, 等. 一株耐盐细菌的分离初步鉴定及对医药废水降解特性的研究[J]. 大连民族学院学报, 2009, 11(3):204-208.
- MA Wen-hua, WU Yue, LI Jin-sheng, et al. Isolation and preliminary identification of a salt-tolerant strain and investigation of its role in medical wastewater degradation[J]. *Journal of Dalian Nationalities University*, 2009, 11(3):204-208.
- [32] 李红梅, 李成云, 李纪顺, 等. 产脲秆杆菌 DnL1-1 与植物联合对阿特拉津的降解[J]. 科学技术与工程, 2017, 17(17):357-360.
- LI Hong-mei, LI Cheng-yun, LI Ji-shun, et al. Atrazine degradation by *Arthrobacter ureafaciens* DnL1-1 in association with plants[J]. *Science Technology and Engineering*, 2017, 17(17):357-360.
- [33] 李红梅, 张新建, 李纪顺, 等. 阿特拉津降解菌 SD41 的分离鉴定及土壤修复[J]. 环境科学与技术, 2014, 37(4):38-41, 129.
- LI Hong-mei, ZHANG Xin-jian, LI Ji-shun, et al. Experimental study on atrazine-degrading strain SD41: Isolation, identification and soil remediation[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 37(4):38-41, 129.
- [34] 栾 敏, 胡 江, 杨兴明, 等. 土壤叶杆菌和红球菌菌株的分离鉴定及其自生固氮作用[J]. 土壤学报, 2009, 46(3):541-546.
- LUAN Min, HU Jiang, YANG Xing-ming, et al. Isolation and identification of *Phyllobacterium* and *Rhodococcus* strains from soils and their free-living nitrogen-fixation[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2009, 46(3):541-546.
- [35] 刘丹丹, 李 敏, 刘润进. 我国植物根围促生细菌研究进展[J]. 生态学杂志, 2016, 35(3):815-824.
- LIU Dan-dan, LI Min, LIU Run-jin. Recent advances in the study of plant growth-promoting rhizobacteria in China[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2016, 35(3):815-824.