

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102876608 A

(43) 申请公布日 2013.01.16

(21) 申请号 201210364081.4

(22) 申请日 2012.09.26

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 6473 2012.08.23

(71) 申请人 中国医药研究开发中心有限公司

地址 102206 北京市昌平区昌平沙河展思门
路 27 号

(72) 发明人 许仁杰 伍树明 伍洲 左丽娟
张思

(74) 专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限
公司 11322

代理人 鲁兵

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C05G 3/00 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 8 页

序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一株解淀粉芽孢杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株高效解磷菌—解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473。冬小白菜 D49 生长试验显示, 土壤中掺有该菌体后, 叶片中的磷含量提高了 36.8%, 根系土壤中的磷含量提高了 80.1%, 说明该菌株具有很强的解磷作用。本发明将对提高磷肥的利用率, 节约磷矿资源, 改善生态环境, 提高作物产量, 以及为制备解磷细菌肥料(如微生物解磷菌剂等)提供优良高效的菌株资源等方面起到重要作用, 应用前景广阔。

1. 一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473。
2. 根据权利要求1所述的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)PS57 CGMCC No. 6473, 其特征在于:其为革兰氏阳性杆菌, 顶端生芽孢; 在YPD培养基上生长良好, 48h形成直径2-3mm大小的圆形菌落, 有运动性, 好氧, 菌落呈白色有光泽, 表面湿润、平坦, 边缘整齐; 生长温度范围: 25°C - 37°C, 最适生长温度: 30°C - 37°C; 生长酸碱度范围: pH2-9, 最适pH值为7.0。
3. 一种高效解磷微生物菌剂, 其活性成分为权利要求1或2所述的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473。
4. 根据权利要求3所述高效解磷微生物菌剂, 其特征在于, 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473的发酵液。
5. 根据权利要求4所述高效解磷微生物菌剂, 其特征在于, 为所述发酵液与草炭、轻质碳酸钙经混合、粉碎得到的, 三者混合比例为1:3-5:0.03-0.05, 优选1:4:0.04(重量比)。
6. 一种得到权利要求4所述解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473的发酵液的方法, 包括以下步骤:
 - 1) 制备一级种子液: 将所述PS57接种于LB液体培养基中, 37°C培养18-20h, 得到一级种子液;
 - 2) 制备二级种子液: 将步骤1)中的一级种子液按照总体积5-8%的接种量接入LB液体培养基中, 于37°C培养22-26h(优选24h), 得到二级种子液;
 - 3) 发酵培养: 将步骤2)中的二级种子液按照总体积5-8%的接种量接入发酵培养基(发酵培养基配方:葡萄糖10g, 豆粕粉10g, 玉米淀粉5g, 酵母粉1g, 磷酸二氢钾1.1g, 氯化钙0.1g, 硫酸镁1.5g, 硫酸锰0.1g, 蒸馏水1000mL, pH7.0; 使用前用常规方法115°C灭菌30min)中, 37°C培养24h, 得到PS57的发酵液。
7. 一种制备权利要求5所述高效解磷微生物菌剂的方法, 将权利要求4所述发酵液与高温灭菌后的草炭、轻质碳酸钙按照的比例在搅拌机内搅拌均匀, 粉碎后得到。
8. 一种活化磷肥, 其特征在于, 包括磷肥和按磷肥质量的1-50%添加的权利要求5所述高效解磷微生物菌剂。
9. 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57CGMCC No. 6473在溶解土壤难溶磷中的应用。
10. 根据权利要求9所述的应用, 其特征在于: 所述土壤难溶磷为包括磷酸钙、磷灰石和磷铁矿中的磷酸三钙等的无机磷, 或包括卵磷脂等在内的有机磷。

一株解淀粉芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一株具有高效解磷能力的芽孢杆菌菌株及其在制备生物活化剂中的应用。

背景技术

[0002] 磷是植物生长发育所必须的矿物质元素之一,植株缺磷时,会出现分蘖推迟、穗粒数减少、籽粒干瘪等现象。我国有74%的耕地土壤缺磷,约有95%的土壤中磷为难溶形式,所以植株很难直接吸收利用。目前,农业生产上多是通过反复施加磷肥来获得高产,但是磷肥施入土壤后易与 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 等金属离子结合生成难溶性的磷酸盐,导致磷肥失效,不能被作物直接利用,这样不仅增加了农业成本,还造成了严重的环境和生态问题。

[0003] 土壤中有许多微生物具有解磷能力,它们可以将土壤中难溶性的有机磷或无机磷转化成植物可以利用的磷,将这类微生物制成解磷菌剂,对提高磷肥利用率、减少磷肥投入和溶解土壤难溶磷等方面起着重要的作用,对保持农业生态环境的平衡、发展持续高效农业具有深远的战略意义。

[0004] 目前,已报道的具有解磷能力的微生物包括细菌、真菌和放线菌等,其中解磷细菌的数量和种类较多,如芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)等。利用解磷细菌制成菌肥施入土壤后,不仅能够提高土壤可溶磷含量,而且能够加强土壤中硝化细菌和其他有益微生物的活动、改善植物根部营养,提高作物的产量。

[0005] 由于解磷菌种类的不同,以及不同解磷菌解磷能力的差异,所以解磷菌的筛选尤为重要。解磷菌筛选的成果如下:

[0006] 现有技术一:“一种解磷真菌及其在制备生物菌肥中的应用”(中国专利文献,申请号:201010590115.2)。该发明采用常规方法从云南省晋宁县磷矿厂矿土中利用解磷微生物筛选培养基,筛选获得解磷真菌*Penicillium oxalicum Mo-Po* 菌株。该发明利用 Mo-Po 菌株堆肥发酵烟草废弃物制备的生物菌肥能作为各种蔬菜种植中的基肥,在土壤含磷量较高的农田里能够作为化学磷肥的替代品。然而,该发明筛选解磷真菌时采集的样品来源范围小,相对来说解磷真菌的种类数量较少,且在传代的过程中容易蜕化,从而在进一步的纯化过程中容易失去解磷能力。

[0007] 现有技术二:“一种当归根际高效解磷菌及其制备得到的菌剂和应用”(中国专利文献,申请号:201110103328.2)。该发明公布了一株当归根际高效解磷菌 *Bacillus sp. DGP01*,该解磷菌能将难溶性的无机磷转化为可供植物直接利用的优质磷素化合物,提高土壤中磷肥利用效率和难溶性磷的生物可溶性。遗憾之处是,该解磷菌只对土壤无机磷具有解磷作用,对难溶性有机磷无效。

[0008] 现有技术三:“高效解磷的丁酸梭菌 A5-4 及应用”(中国专利文献,申请号:201010153419.2)。该发明从化粪池底泥中分离筛选得到一株高效解磷的丁酸梭菌,该菌株可以在厌氧的条件下溶解磷酸钙,将该菌株制成微生物菌肥后施入土壤,可以提高土壤中

的可溶磷含量。然而，该解磷菌时采集地点限于无氧环境，筛选出的菌株为厌氧菌，即对水生作物如水稻或是水产品养殖等具有解磷能力，对大多数好氧作物没有什么效果，应用范围较小。

发明内容

[0009] 本发明的目的是提供一株高效解磷菌即解淀粉芽孢杆菌，该菌株对土壤中的难溶性的有机磷和无机磷均具有较好的溶解效果。

[0010] 本发明所提供的高效解磷芽孢杆菌，为一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473。

[0011] 所述的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473，是革兰氏阳性杆菌，顶端生芽孢；在YPD培养基上生长良好，48h形成直径2-3mm大小的圆形菌落，有运动性，好氧，菌落呈白色有光泽，表面湿润、平坦，边缘整齐；生长温度范围：25°C -37°C，最适生长温度：30°C -37°C；生长酸碱度范围：pH 2-9，最适pH值为7.0。

[0012] 本发明另一目的在于提供一种高效解磷微生物菌剂，其活性成分为所述的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473。

[0013] 该高效解磷微生物菌剂，为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473的发酵液；或为所述发酵液与草炭、轻质碳酸钙经混合、粉碎得到的，三者混合比例为1:3-5:0.03-0.05，优选1:4:0.04(重量比)。

[0014] 本发明还一目的在于提供一种得到所述解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473的发酵液的方法，包括以下步骤：

[0015] 1)制备一级种子液：将所述PS57接种于LB液体培养基中，37°C培养18-20h，得到一级种子液；

[0016] 2)制备二级种子液：将步骤1)中的一级种子液按照总体积5-8%的接种量接入LB液体培养基中，于37°C培养22-26h(优选24h)，得到二级种子液；

[0017] 3)发酵培养：将步骤2)中的二级种子液按照总体积5-8%的接种量接入发酵培养基(发酵培养基配方：葡萄糖10g，豆粕粉10g，玉米淀粉5g，酵母粉1g，磷酸二氢钾1.1g，氯化钙0.1g，硫酸镁1.5g，硫酸锰0.1g，蒸馏水1000mL，pH7.0；使用前用常规方法115°C灭菌30min)中，37°C培养24h，得到PS57的发酵液。

[0018] 本发明再一目的在于提供一种制备所述高效解磷微生物菌剂的方法，将所述发酵液与高温灭菌后的草炭、轻质碳酸钙按照的比例在搅拌机内搅拌均匀，粉碎后得到。

[0019] 本发明还提供一种活化磷肥，包括磷肥和按磷肥质量的1-50%添加的所述高效解磷微生物菌剂。

[0020] 本发明还提供解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473在溶解土壤难溶磷中的应用。

[0021] 该应用中，所述土壤难溶磷为包括磷酸钙、磷灰石和磷铁矿中的磷酸三钙等的无机磷，或包括卵磷脂等在内的有机磷。

[0022] 本发明基于一株高效解磷菌—解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473提出以上技术方案，该菌株是从安徽的植物根围土壤中经分离、纯化筛选得到的高效解磷菌株。在实验室培养环境下，该菌株能够可溶提高土壤中的可溶磷

含量,将用该菌株制成的菌剂和土壤充分混匀后,播种冬小白菜 D49(种子,购自昌平区沙河南大桥农贸市场),于温室中培养 40 天,然后收获植株,测量叶片中的磷含量和根系土壤中的可溶磷含量,结果叶片中的磷含量提高了 36.8%,根系土壤中的可溶磷含量提高了 80.1%,说明该菌株具有很强的解磷作用。本发明将对提高磷肥的利用率,节约磷矿资源,改善生态环境,提高作物产量,以及为制备解磷细菌肥料(如微生物解磷菌剂等)提供优良高效的菌株资源等方面起到重要作用,应用前景广阔。

[0023] 下面结合具体实施例对本发明做进一步详细说明。

附图说明

[0024] 图 1 为磷标准曲线。

具体实施方式

[0025] 本发明从土壤中筛选出一株具有较强解磷能力的菌株,即解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),名称为 PS57,该菌株已于 2012 年 8 月 23 日保藏于位于中国北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为 CGMCC No. 6473。

[0026] 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciences*) PS57CGMCC No. 6473 是革兰氏阳性杆菌,顶端生芽孢;在 YPD 培养基上生长良好,48h 形成直径 2-3mm 大小的圆形菌落,有运动性,好氧,菌落呈白色有光泽,表面湿润、平坦,边缘整齐;生长温度范围:25°C -37°C,最适生长温度:30°C -37°C;生长酸碱度范围:pH 2-9,最适 pH 值为 7.0;部分生化特性如表 1 所示:

[0027] 表 1 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciences*)

[0028] PS57CGMCC No. 6473 的部分生化特性

试验项目	结 果
V-P 测定	+
淀粉水解	+
吲哚产生	+
明胶液化	+
葡萄糖氧化发酵	+
甲基红	+
运动性	+
厌氧生长	-
氧化酶	-
过氧化氢酶	-

[0030] 注:“+”表示反应阳性;“-”表示反应阴性。

[0031] 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciences*)PS57CGMCC No. 6473 的筛选过程记载于实施例中。

[0032] 在上述基础上,本发明还继续提供了一种高效解磷微生物菌剂。本发明所提供的菌剂,其活性成分为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)PS57 CGMCC No. 6473。

[0033] 以下以实施例进一步详述本发明。实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法。

[0034] 实施例 1、高效解磷菌解淀粉芽孢杆菌 PS57 CGMCC No. 6473 的筛选及保藏

[0035] 用本发明的方法筛选高效解磷菌,即解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),具体方法包括以下步骤:

[0036] 1、初筛

[0037] 筛选物品为来自北京小汤山、安徽合肥、河北廊坊、湖北宜昌、山东烟台、新疆贾登岭、河南南阳等地的农作物或园艺植物根围土壤。具体筛选方法为:每份土样称取 5g,分别放入盛有 100mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,在摇床上剧烈振荡 30min 后于 80℃ 的水浴中保持 15–20min。然后用无菌水进行梯度稀释成 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 后涂布筛选平板(无机磷细菌筛选培养基的配方为:葡萄糖 10g,磷酸三钙 5g,硫酸铵 0.5g,氯化钠 0.2g,硫酸镁 0.1g,氯化钾 0.2g,酵母粉 0.5g,硫酸锰 0.002g,0.4% 溴酚蓝(pH6.7)6mL,琼脂 18g,蒸馏水 1000mL, pH 自然;使用前用常规方法 115℃ 灭菌 30min),每梯度涂 2–3 皿,于 30℃ 培养箱内培养 72h,挑取菌落形态差异明显的单菌落,选择溶磷圈直径大(溶磷圈直径大于 3)及 HD/CD(溶磷圈 / 菌落直径,解磷指数)数值大(HD/CD 数值大于 2)的菌落,转接于 LB 斜面培养基(LB 培养基配方:10g 胰蛋白胨,5g/ 酵母粉,10g NaCl,蒸馏水 1000mL, pH 7.0–7.2,固体培养基加入 2% 琼脂;使用前用常规方法 115℃ 灭菌 30min)中备用。

[0038] 2、细菌解磷能力的测定

[0039] 2.1 检测细菌对无机磷的解磷能力

[0040] 用无机磷细菌液体培养基(配方为:葡萄糖 10g,硫酸铵 0.5g,酵母粉 0.5g,氯化钠 0.3g,氯化钾 0.3g,硫酸镁 0.3g,硫酸亚铁 0.03g,硫酸锰 0.03g,磷酸钙($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)5g(水不溶物),蒸馏水 1000mL, pH 7.0–7.5,使用常规方法 115℃ 灭菌 30min)测定菌株的解磷能力,测定方法为:先预培养:将细菌接种到盛有 LB 液体培养基的三角瓶中,置 30℃、200rpm 摆床振荡培养 24h 得到预培养菌液;然后进行二次培养:将细菌转接到装有无机磷细菌液体培养基的三角瓶中,每 10mL 培养基中加入预培养菌液 100u1,置 30℃、200rpm 摆床振荡培养 72h;培养结束后加入无磷活性碳脱色,然后 12000rpm 高速离心 10min,将上清液倾出待测。用钼锑抗比色法测定上清液中磷含量,得到培养菌液中可溶磷的量,菌液中可溶磷量越高表明对应菌株解磷能力越强。磷含量具体测定方法如下:

[0041] 2.1.1) 吸取上清液 0.5mL 置于 50mL 容量瓶中,用水稀释至 20mL,用 1M NaOH 或稀硫酸溶液调节 pH 至 3.0,然后到预先置有 5mL 钼锑抗显色剂【钼锑抗显色剂:称 1.5g 抗坏血酸($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$, 左旋比旋光度 +21–22 度),溶于 100mL 钼锑抗贮存液中,此液随配随用,可溶期 1 天;钼锑抗储存液:浓硫酸(H_2SO_4)(分析纯)153mL 缓缓地倾入约 400mL 蒸馏水)中,搅拌、冷却,10.0g 钼酸铵(分析纯溶于约 60℃ 的 300mL 水中,冷却,然后将硫酸溶液缓缓滴入钼酸铵溶液中,再加入 100mL 0.5% 酒石酸锑钾溶液 [$\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$, 分析纯],最后用水稀释至 1L,盛于棕色瓶中】的 50mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。在室温(20℃ –25℃)下放置 30min 后用分光光度计在波长 700nm 比色。读取数值,利用磷标准曲线计算出显色

液中磷的读数。颜色在 8h 内可保持稳定。

[0042] 2.1.2) 磷标准曲线的绘制 : 分别吸取 5mg/L 磷标准溶液 (5mg/L 磷标准液 : 称取在 105℃ 烘箱中烘 2h 后冷却的磷酸二氢钾 0.439g 溶于 200mL 水中, 加入 5mL 浓硫酸, 转入 1L 容量瓶中, 用蒸馏水定溶至刻度即为 100mg/L 磷标准液, 可长期保存备用。取此溶液准确稀释 20 倍即为 5mg/L 磷标准液, 此溶液不宜久放) 0、1、2、3、4、5、6mL 于 50mL 容量瓶中, 加水稀释至约 20mL, 加入钼锑抗显色剂 5mL, 摆匀定容, 即得 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6mg/L 磷标准系列溶液, 用分光光度计上在波长 700nm 比色分析, 得到各溶液的吸光值数值。以吸光值为纵坐标, 磷浓度为横坐标, 绘制磷标准工作曲线, 如图 1 所示。

[0043] 2.2 检测细菌对无机磷的解磷指数

[0044] 利用平板检测 : (1) 分别将 PS16、PS21、PS57、PS69、PS81、PS87、PS94、PS123、PS158、PS202、PS214 共 11 株细菌转接至已灭菌的 LB 液体培养基, 置于 30℃ 培养箱培养 24 小时。(2) 用移液器吸取 10ul 菌液滴到无机磷细菌固体培养基平板上(无机磷细菌固体培养基的配方为 : 葡萄糖 10g, 磷酸三钙 5g, 硫酸铵 0.5g, 氯化钠 0.2g, 硫酸镁 0.1g, 氯化钾 0.2g, 酵母粉 0.5g, 硫酸锰 0.002g, 0.4% 溴酚蓝 (pH6.7) 6mL, 琼脂 18g, 蒸馏水 1000mL, pH 自然 ; 使用常规方法 115℃ 灭菌 30min) 置于 30℃ 恒温箱中培养 72h, 观察菌落生长情况及透明圈产生情况、测量菌落直径和透明圈直径, 计算解磷指数 HD/CD (溶磷圈 / 菌落直径)。

[0045] 2.3 测定结果 :

[0046] 不同菌株在无机磷细菌筛选平板上的解磷指数和在无机磷细菌液体培养基中的解磷能力测定结果如表 1 所示。不同标号的解磷菌解磷能力的测量, 是将该号菌液与其经高温高压灭活的死菌液同时进行比色分析(以灭活菌液为参照)得出的。

[0047] 结果确定 PS57 为一株高效解磷细菌, 该解磷菌株发酵液中的可溶无机磷含量为 55.8mg/L, 较空白对照样品(可溶无机磷含量 28.6mg/L, 是将培养基在 121° 灭菌 20min, 作为空白对照) 提高 95.1%。

[0048] 表 1 解磷菌 PS57 和其他解磷菌株的解磷指数和解磷能力测定结果

[0049]

菌土株 (采集地点)	解磷指数*	磷酸钙原始量 (g/L)	解磷能力* 以磷酸根计 (mg/L)
PS16 (北京小汤山)	2.6±0.3	5g/L	29.3±0.1
PS21 (北京小汤山)	3.1±0.3	5g/L	32.9±0.3
PS57 (安徽合肥)	4.8±0.3	5g/L	55.8±0.1
PS69 (安徽合肥)	3.2±0.3	5g/L	32.8±0.2
PS81 (河北廊坊)	3.4±0.3	5g/L	37.6±0.1
PS87 (河北廊坊)	2.7±0.3	5g/L	32.8±0.1
PS94 (湖北宜昌)	1.9±0.3	5g/L	20.7±0.3
PS123 (山东烟台)	2.5±0.3	5g/L	28.6±0.2
PS158 (新疆贾登岭)	2.3±0.3	5g/L	37.4±0.1

[0050]

PS202 (河南南阳)	3.3±0.3	5g/L	27.6±0.1
PS214 (河南信阳)	3.1±0.3	5g/L	33.6±0.3
空白对照	-	-	28.6

[0051] *解磷指数 :HD/CD= 溶磷圈直径 / 菌落直径

[0052] *解磷能力 :发酵液中磷含量以磷酸根计

[0053] 2.4 PS57 对有机磷的解磷指数和解磷能力检测

[0054] 有机磷细菌液体培养基配方为 :葡萄糖 10.0g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, NaCl 0.3g, KCl 0.3g, FeSO_4 0.03g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.03g, 酵母膏 0.4g, 卵磷脂 0.2g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0 ; 使用常规方法 115°C 灭菌 30min。

[0055] 用与 2.2 相同的方法测定 PS57 针对有机磷的解磷指数。其中, 吸取 LB 液体培养基预培养的菌液 10 μL 滴加到有机磷细菌固体培养基平板上(有机磷细菌固体培养基为 1000mL 加 18g 琼脂的有机磷细菌液体培养基)。

[0056] 用与 2.1 同样的方法测定菌株 PS57 的解磷能力。其中使用的培养基是有机磷细菌液体培养基。

[0057] 测定结果 :PS57 菌株在有机磷细菌筛选平板上的解磷指数和在有机磷细菌液体培养基中的解磷能力测定结果列于表 2。结果确定 PS57 对有机磷也有一定的解磷能力。

[0058]

菌土株 (采集地点)	解磷指数*	卵磷脂原始量 (g/L)	解磷能力* 以磷酸根计 (mg/L)
PS57 (安徽合肥)	1.3±0.3	0.2	3.2
空白对照		0.2	0.9

[0059] 2.5 解磷细菌 PS57 的 16S rDNA 鉴定

[0060] 提取步骤 2) 筛选得到的高效解磷菌株 PS57 的总 DNA, 提取方法包括以下步骤 :

[0061] 1) 将过夜培养的菌液按 5% 接种于 50mL LB 培养基中, 37°C、200rpm 培养 5h ;

[0062] 2) 4°C、8000rpm 离心 30 秒收集菌体 ;

[0063] 3) 用 10mL TE (pH8.0) 洗涤菌体两次 ;

[0064] 4) 加入 0.5mL TE 悬浮菌体, 再加入 0.5mL 4.0mg/mL 的溶菌酶(蛋白酶 K)溶液 [溶于 10mM Tris · HCl (pH8.0)], 混匀, 37°C 水浴保温 30min ;

[0065] 5) 加入 10mL 65°C 预热的 CTAB 提取液 (CTAB 提取液 :0.1M Tris · HCl (pH8.0), 2% (w/v) CTAB, 0.02M EDTA, 1.4M NaCl), 65°C 水浴保温 45min, 中间小心混匀几次 ;

[0066] 6) 加入等体积的 Tris 饱和酚抽提一次 ;

[0067] 7) 再用等体积酚 / 氯仿 (1:1) 抽提一次 ;

[0068] 8) 加入两倍体积冰预冷的乙醇沉淀 DNA, -70°C 放置 30min, 或 -20°C 放置 2h ;

[0069] 9) 12,000rpm 离心 10min, 弃上清 ;

[0070] 10) 70% 乙醇洗涤两次, 每次 10mL ;

[0071] 11) 12,000rpm 离心 5min, 小心吸去上清液, 将附于管壁的液滴出尽。37℃放置 15min, 干燥后溶于 300 μL TE。

[0072] 以提取的总 DNA 为模板, 在原核生物 16S rRNA 基因的通用引物 F27:5' -AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' 和 F27:5' -AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3' 的引导下进行 16S rDNA 基因的 PCR 扩增, 扩增条件为 :95℃ 5min ;再(95℃ 1min, 56.7℃ 50s, 72℃ 2min30sec) 32 个循环 ;72℃ 10min。扩增结束后, 对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用 DNA 片段快速胶回收试剂盒(北京鼎国昌盛生物技术有限公司)回收 1431bp 的目的片段, 然后以该回收片段为模板进行 DNA 测序。测序结果表明, 该细菌的 16S rDNA 序列如序列表中序列 1 所示, 将测得的序列提交到 GENBANK 数据库中进行 BLAST 比对分析, 根据结果大体确定解磷细菌的种类。结果序列最为一致的是源自安徽合肥土壤的菌株 PS57, 与 *Bacillus amyloliquefaciens* 的序列 (Genbank 号 :JF899255.1) 相应, 序列一致性为 100%, 确定该菌株为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*), 命名为 PS57。该菌株已于 2012 年 8 月 23 日保藏于位于中国北京大屯的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心, 保藏编号为 CGMCCNo. 6473。

[0073] 实施例 2、解磷菌的培养

[0074] 本发明解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57CGMCC No. 6473 培养方法包括以下步骤 :

[0075] 1) 制备一级种子液: 取甘油管保藏的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473, 接种于装有 50mL 的 LB 液体培养基的三角瓶中, 37℃ 培养 18-20h, 得到 PS57 的一级种子液, 按照平板菌落计数法测定培养基中的活菌数, 结果一级种子液中的活菌数达到 2.7×10^9 个 /mL。

[0076] 2) 制备二级种子液: 将步骤 1) 中的一级种子液按照总体积 5-8% 的接种量接入装有 1.5L LB 液体培养基的二级种子培养瓶中, 于 37℃ 培养 24h, 得到二级种子液, 按照平板菌落计数法测定培养基中的活菌数, 结果二级种子液中的活菌数达到 2.1×10^9 个 /mL。

[0077] 3) 发酵培养: 将步骤 2) 中的 PS57 的二级种子液按照总体积 5-8% 的接种量接入装有 50L 发酵培养基(发酵培养基配方: 葡萄糖 10g, 豆粕粉 10g, 玉米淀粉 5g, 酵母粉 1g, 磷酸二氢钾 1.1g, 氯化钙 0.1g, 硫酸镁 1.5g, 硫酸锰 0.1g, 蒸馏水 1000mL, pH 7.0; 使用常规方法 115℃ 灭菌 30min) 的培养瓶中, 37℃ 培养 24h, 得到 PS57 的发酵液, 按照平板菌落计数法测定培养基中的活菌数, 结果发酵液中的活菌数达到 1.6×10^9 个 /mL。

[0078] 实施例 3: 含有 PS57 细菌菌体的微生物菌剂及应用

[0079] 含有 PS57 细菌菌体的微生物菌剂, 可以有多种形式:

[0080] 1、直接以发酵液(固体含量约占 5%-50%)形成的菌悬液, 可作为肥料的生物活化剂施用于作物土壤中, 起到解磷作用。

[0081] 2、添加吸附剂如草炭、草木灰、蛭石等载体, 形成含水量为 10%-30% 的固体, 可作为肥料的生物活化剂施用于作物土壤中, 起到解磷作用。

[0082] 3、添加吸附剂如草炭、草木灰、蛭石等载体, 形成含水量为 10%-30% 的固体后, 作为生物活化剂添加到磷肥(磷矿粉制成)中, 生物活化剂添加比例可为磷肥的 1-50% (按质量), 以此形成活化磷肥共同施用于作物土壤中。这里, 活化磷肥中发挥菌剂的解磷能力, 使难溶的磷酸三钙转化成磷酸一钙和磷酸二钙等。

[0083] 一个具体的 2-3 的应用实例为 : 将实施实例 2 中发酵培养好的发酵液与高温灭菌后的草炭(购自北京清河花卉市场)、轻质碳酸钙(购自北京市金顶碳酸钙厂)按照 1:4:0.04 的比例(重量比)在搅拌机内搅拌均匀, 形成潮湿的固体(含水量约为 10%-30%), 粉碎后得到 PS57 生物活化剂。

[0084] 该生物活化剂中按照平板菌落计数法计算活菌数, 结果其中解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473 的活菌数为 1.1×10^9 个 /mL。

[0085] 实施例 4、解磷芽孢杆菌促植物生长盆栽效果实验

[0086] 检测解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473 对植物生长的影响, 同时设空白对照进行效果对比试验。共分为 2 个处理级别, 第一组为测试组, 在盆栽土壤中按每千克土壤加入 PS57 菌发酵液 3mL; 第二组为对照组, 在盆栽土壤中接入和上述菌液同体积的空白 LB 培养基。两试验组土壤中均播种冬小白菜 D49 (种子, 购自昌平区沙河南大桥农贸市场), 于温室中培养, 培养条件为 : 培养室昼夜循环为 16h 光照 /8h 黑暗, 昼夜温度控制在 20-25℃, 相对湿度控制在 30-40%。盆栽试验 40 天结束后, 收获植株, 测量株高、根长、鲜重、干重、叶片中的磷含量(检测方法为 : 电炉法, 李会娟, 测定小麦籽粒中全磷含量的 2 种消解方法的比较 [J]; 现代农业科技 ;2011 年 06 期) 和根系土壤中的可溶磷含量(检测方法为 : 王芹, 徐清波, 姚振琴等, 土壤中可溶磷的测定 [J]; 仪器仪表与分析监测 ;2009 年 04 期)。

[0087] 试验结果如表 3 所示。通过数据比较可见, 施加 PS57 菌发酵液前土壤中的磷大部分以难溶性形式存在, 施加菌剂后土壤中的难溶性磷转化为的磷而被植株利用, 施加了 PS57 菌发酵液植株的株高、根长、鲜重、干重、叶片中磷含量、及根系土壤中磷的含量均显著高于对照组, 说明本发明解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) PS57 CGMCC No. 6473 有较好的解磷能力, 为解磷菌。

[0088] 表 2 PS57 对冬小白菜促生长试验结果(盆栽试验)

[0089]

处理	株高 (cm)	根长 (cm)	鲜重 (g)	干重 (g)	叶片中含磷量 (%)	根系土壤中的磷含量 (mg/kg)
空白 对照	30.1±1.38	3.15±0.29	29.1±1.39	1.41±0.06	0.19±0.03	3.43±0.82
样品	36.2±1.48	6.88±0.30	41.1±1.28	1.83±0.08	0.26±0.02	6.18±0.96

[0001]

序列表

<110> 中国医药研究开发中心有限公司

<120> 一株解淀粉芽孢杆菌及其应用

<130> CGCNB125116W

<160> 1

<210> 1

<211> 1431

<212> rDNA

<213> PS57 CGMCC No. 6473 的 16S rDNA

<400> 1

gctatacatg caagtcgagc ggacagatgg gagcttgc	60
c cttgtta gcgccggacg	
ggtagtaac acgtggtaa cctgcctgta agactggat aactccgg	120
a aaccgggat aaccgggat gttgtttga accgeatggt tcagacataa aaggtggc	180
ttt cggttaccac ttacagatgg acccgccg cattagctag ttggtgaggt aacggctcac caaggcga	240
cg atgcgttagcc gacctgagag ggtgategca cacactggg	300
ctgagacacg gcccagactc ctacggagg cagcagttagg gaatcttccg caatggacga aagtctgacg gagcaacg	360
cc gctgtgtaa tgaaggttt cggatcgtaa agctctgtt tagggaaga acaagtgc	420
cg ttcaaataagg gcccacett gacggtacct aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca	480
geagccgegg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggaa ttattggcgtaaaggc	540
gttgcgtt tcttaagtct gatgtgaaag cccccggctc aaccggggag ggtcattgg	600
aaactgggaa cttgagtgc a aagaggaga gtgaaattcc acgtgtacg gtgaaatgc	660
tagagatgtg gaggaacacc agtggcgaag gcgactctt ggtctgttaac tgaegctgag	720
gagcgaaage gtggggagcg aacaggatta gataccctgg tagtccacgc cgtaaacat	780
gatgtcta a gtttagggg ttccgcccc ttatgtgtgc agctaacgc ttaagcactc	840
cgccctgggaa gtacggtcgc aagactgaaa ctcaaaggaa ttgacgggg cccgcacaag	900
cggtggagca ttttgtttaa ttatgtgtgc agctaacgc ttaagcactc	960
tatgtgtgc ttttgtttaa ttatgtgtgc agctaacgc ttaagcactc	1020

[0002]

tgtcgtcage tcgtgcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgat	1080
cttagttgcc agcattcagt tggcactct aaggtaactg ccggtgacaa accggaggaa	1140
ggtgtggatg acgttcaatac atcatgcccc ttatgacctg ggctacacac gtgttacaat	1200
ggacagaaca aaggcagcg aaaccgcgag gttaagccaa tccccacaaat ctgttctcag	1260
ttcggatcgc agtctgcaac tegactgcgt gaagctggaa tcgctagtaa tcgcccgtca	1320
gcatgcgcg gtgaatacgt tccccggcct tgtacacacc gcccgtcaca ccacgagagt	1380
ttgttaacacc cgaagtcggt gaggtaacct ttatggagcc ageegccgaa g	1431

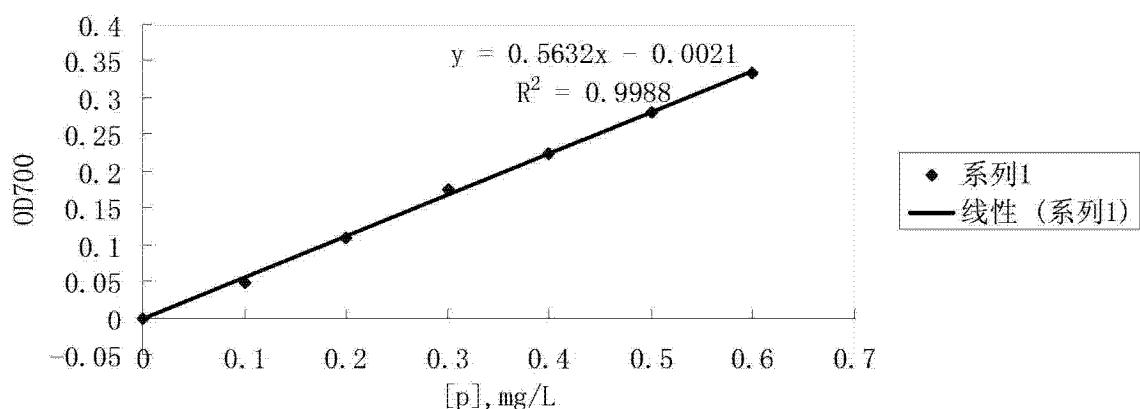


图 1