



(21) 申请号 202411686676.0

(22) 申请日 2024.11.25

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 119242529 A

(43) 申请公布日 2025.01.03

(83) 生物保藏信息

CGMCC No.31726 2024.08.23

(73) 专利权人 中国水利水电科学研究院

地址 100000 北京市海淀区车公庄西路20

号

专利权人 北京大学

(72) 发明人 罗忠新 王忠玮 罗久富 朱先芳

马百兵 隋欣 籍国东

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 高春月

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C09K 17/14 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

C09K 101/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 111662847 A, 2020.09.15

CN 114644984 A, 2022.06.21

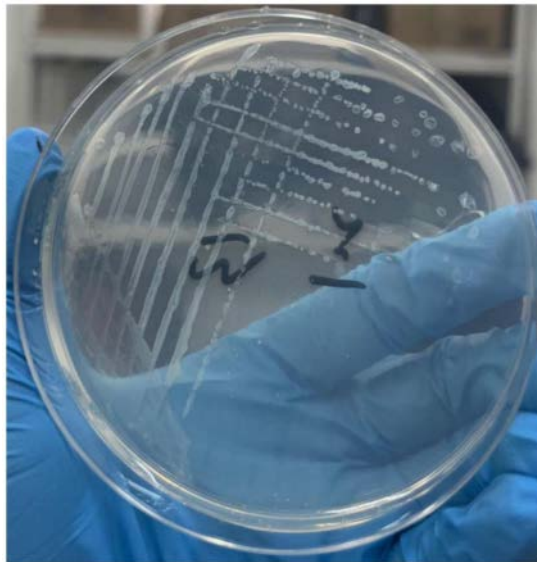
审查员 王平洋

(54) 发明名称

一种具有固碳能力的肠杆菌GD-13及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种具有固碳能力的肠杆菌GD-13及其应用,涉及微生物技术领域。本发明所述的肠杆菌分类命名为华西肠杆菌 *Enterobacter huaxiensis*,保藏编号为CGMCC No.31726。本发明所述肠杆菌从石漠化区域光伏场区固定式板间土壤中分离。经实验表明,所述的肠杆菌在极低营养的盐类培养基中能保持良好的生长活性和固碳能力,在外加无机碳源时可不同程度提高其固碳能力,尤其是在外加无机碳源 Na_2CO_3 的条件下,其固碳能力显著提高,且外加电子供体可进一步提高其固碳能力。本发明分离获得的肠杆菌对于提升土壤固碳增汇潜力,推动石漠化脆弱区光伏产业高质量发展、缓解全球气候变暖具有重要科学意义。



1. 一种华西肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*) GD-13, 其特征在于, 保藏编号为 CGMCC No. 31726。
2. 一种土壤改良剂, 其特征在于, 所述土壤改良剂含有权利要求1所述的华西肠杆菌 GD-13。
3. 权利要求1所述的华西肠杆菌 GD-13 或权利要求2所述的土壤改良剂在土壤固碳中的应用。
4. 根据权利要求3所述的应用, 其特征在于, 所述土壤为岩溶土壤。
5. 权利要求1所述的华西肠杆菌 GD-13 在解磷中的应用。
6. 根据权利要求5所述的应用, 其特征在于, 所述解磷为华西肠杆菌 GD-13 将难溶性无机磷溶解为可溶性磷酸盐。
7. 权利要求1所述的华西肠杆菌 GD-13 在固定无机碳中的应用。
8. 根据权利要求7所述的应用, 其特征在于, 所述无机碳为二氧化碳、碳酸钠和碳酸氢钠中的一种或多种。

一种具有固碳能力的肠杆菌GD-13及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术领域,具体为一种具有固碳能力的肠杆菌GD-13及其应用。

背景技术

[0002] 新能源开发已成为应对气候变化的核心途径,但是新能源80%以上分布在脆弱区(如石漠化地区)。石漠化脆弱区土层浅薄、富钙偏碱,生态系统十分脆弱,严重制约着区域经济社会的发展,亟需探索能源与生态修复、特色产业发展有机融合的新模式。

[0003] 目前,关于石漠化脆弱区域生态光伏关键技术研究主要集中在光伏场区气象效应监测与评价、土壤异质性影响监测评等方面,缺少光伏场区土壤功能微生物精准识别与筛选相关研究。亟需通过解析关键微生物的碳转化途径和策略,分离筛选光伏场区高效固碳土著功能微生物,这对激发提升土著微生物改良土壤及固碳增汇的协同效益有重要的潜在应用价值。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种具有固碳能力的肠杆菌GD-13及其应用,该肠杆菌GD-13具有固定无机碳源的能力,尤其能够高效实现碳酸盐的固定,在寡营养条件下有较强的适应力,同时其具有解磷能力。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供了以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种肠杆菌GD-13,所述肠杆菌GD-13的分类命名为华西肠杆菌 *Enterobacter huaxiensis*,保藏编号为CGMCC No.31726。

[0007] 优选地,所述肠杆菌GD-13的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 本发明还提供了一种土壤改良剂,所述土壤改良剂包括所述的肠杆菌GD-13。

[0009] 本发明还提供了一种所述的肠杆菌GD-13或所述的土壤改良剂在提高土壤固碳能力中的应用。

[0010] 优选地,所述土壤为岩溶土壤。

[0011] 本发明还提供了一种所述的肠杆菌GD-13在解磷中的应用。

[0012] 优选地,所述解磷为肠杆菌GD-13将难溶性无机磷溶解为可溶性磷酸盐。

[0013] 本发明还提供了一种所述的肠杆菌GD-13在固定无机碳中的应用。

[0014] 优选地,所述无机碳包括二氧化碳、碳酸钠和碳酸氢钠中的一种或多种。

[0015] 本发明与现有技术相比,具有以下有益效果:

[0016] 本发明提供了一株肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*) GD-13,该菌株能够高效实现对碳酸盐的固定能力,在寡营养条件下具有较强的适应力,同时其具有解磷能力,溶磷能力为407.32mg/L。经实验表明,本发明将肠杆菌GD-13接种于含有不同无机碳源的培养基中,该菌可固定培养基中的碳;通过外加无机碳源,尤其是碳酸钠,可显著提高其固碳能力。本发明用添加不同电子供体的培养基培养肠杆菌GD-13,其固碳过程具有不同程度的增强作用。本发明首次公开了肠杆菌具有固定无机碳源的能力,为提升石漠化土壤的固碳减排

能力提供菌种资源,为深入了解石漠化土壤营养物质赋存形态的微生物调节过程提供理论依据,为提出光伏场区土壤微生物改良技术奠定基础,推动石漠化脆弱区光伏产业高质量发展。

[0017] 生物保藏信息

[0018] 本发明所述的肠杆菌GD-13分类命名为华西肠杆菌*Enterobacter huaxiensis*,保藏单位:中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心;保藏单位地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号;保藏编号:CGMCC No.31726;保藏日期:2024年8月23日。

附图说明

[0019] 图1是本发明肠杆菌GD-13的菌体形态图。

[0020] 图2是本发明肠杆菌GD-13的菌落特征图。

[0021] 图3是本发明肠杆菌GD-13的16S rRNA基因的系统发育树。

[0022] 图4是本发明肠杆菌GD-13的RubisCO酶活性,图中GD-13为本发明肠杆菌,1~4为其他4株固碳菌。

[0023] 图5是本发明肠杆菌GD-13在不同条件下的固碳能力,图中a、b、c不同字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著。

[0024] 图6是本发明肠杆菌GD-13的固碳途径。

[0025] 图7是本发明肠杆菌GD-13在含难溶性磷盐的液体培养基中培养后的有效磷含量,图中GD-13为本发明肠杆菌,1~4为其他4株固碳菌,a、b、c不同字母表示在 $p < 0.05$ 水平差异显著。

具体实施方式

[0026] 本发明提供了一种肠杆菌GD-13,所述肠杆菌GD-13的分类命名为华西肠杆菌*Enterobacter huaxiensis*,保藏编号为CGMCC No.31726。本发明肠杆菌GD-13从云南省石林县石漠化光伏场区土壤中分离获得。本发明利用扫描电镜确定该菌株菌体形态为杆状,其在固体培养基上产生的菌落小,呈脐状,白色,不透明,表面光滑黏稠,边缘不规则。

[0027] 在本发明中,所述肠杆菌GD-13的核苷酸序列为CGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTCTTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGTAGCATTCTGATCTACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGCTAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTCTTTCGCGTTGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTCGGGGCCCCGTC AATTCATTTAGTTTTTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACTCCTCAAGGGAACAACCTCCAAGTCGACATCGTTTACGGCGTGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTC TACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTG

CTGGCACGGAGTTAGCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGATGAGGTTATTAACCTCATCACCTTCCTCC
CCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCATACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTG
CAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTGGTCATCCTCTCAGA
CCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCCACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAA
GAGGCCCGAAGGTCCCCCTCTTTGGTCTTGCACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCCAGTAGTTATCCCCCTC
CATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTACCCGTCGCCGCTCGTCACCCA (SEQ IDNO.1)。

[0028] 本发明还提供了一种土壤改良剂,所述土壤改良剂包括所述的肠杆菌GD-13。作为一种可以实施的方式,本发明所述的土壤改良剂的有效成分包括肠杆菌GD-13;所述土壤改良剂还可以包括可接受的辅料。作为另一种可以实施的方式,所述土壤改良剂的唯一成分为肠杆菌GD-13。

[0029] 本发明还提供了一种所述的肠杆菌GD-13或所述的土壤改良剂在提高土壤固碳能力中的应用。在本发明中,所述土壤优选为岩溶土壤。经实验表明,本发明所述的肠杆菌GD-13能够在极低营养的盐类培养基中生长,且其生长活性和固碳能力可受电子供体驱动,同时其在碳酸盐含量较高的土壤环境中具有更高的固碳潜力,这有助于开发菌株在特殊环境(如岩溶土壤)中的应用。

[0030] 本发明还提供了一种所述的肠杆菌GD-13在解磷中的应用。所述解磷优选为肠杆菌GD-13将难溶性无机磷溶解为可溶性磷酸盐。本发明通过以溶解磷酸三钙的能力为指标,确定本发明所述的肠杆菌GD-13具有解磷能力,实现了对难溶性磷酸盐的利用,其溶磷能力为407.32mg/L,显著高于其他菌株。

[0031] 本发明还提供了一种所述的肠杆菌GD-13在固定无机碳中的应用。所述无机碳优选地包括二氧化碳、碳酸钠和碳酸氢钠中的一种或多种。本发明将肠杆菌GD-13的菌液进行RubisCO酶活性测定,其RuBisCO酶活性约为17.02U/mg prot,具有较强固碳能力。另外,肠杆菌GD-13在不同无机碳源及不同电子供体下的固碳能力也存在差异。当外加无机碳源时,其菌株浓度在 NaHCO_3 、 Na_2CO_3 添加下分别增加至约4.5倍和12.7倍。当外加电子供体时,菌株固碳能力进一步提升,相比于仅添加 NaHCO_3 ,外加 NaNO_2 和 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 时其菌株浓度再次增加约2.7倍和3.0倍,说明电子供体能为菌株固碳提供更多能量。

[0032] 下面结合实施例对本发明提供的技术方案进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0033] 下面实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为市售产品。

[0034] 实施例1固碳菌肠杆菌*Enterobacterhuaxiensis* GD-13的分离及鉴定

[0035] 以云南省石林县的石漠化光伏场区固定式板间土壤为目标土壤,具体筛选方案如下:

[0036] 1、采集0~20cm深度的土壤,取采集的土壤10.0g,加入到100mL灭菌水中,置于摇床上进行震荡(180转/分钟,摇30min),制成土壤悬浊液。之后将土壤悬浮液按10倍梯度稀释至 10^{-4} 倍,取0.2mL土壤稀释液,涂布至不含有有机碳源的固体培养基中,在28°C条件下培养7天。固体培养基成分为: Na_2HPO_4 ,0.5g/L; KH_2PO_4 ,0.5g/L; MgSO_4 ,0.3g/L; CaCl_2 ,0.2g/L; NaHCO_3 ,0.5g/L; NH_4Cl ,0.5g/L; NaNO_3 ,0.25g/L; NaCl ,0.4g/L;微量元素溶液,10mL/L;琼脂,20g/L,pH 7.0。所述微量元素溶液的配方为: FeCl_2 ,0.3g/L; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.3g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot$

H₂O, 0.15g/L; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.25g/L; CoCl₂, 0.2g/L。

[0037] 2、挑取不含有有机碳源的固体培养基中形态及长势较好、生长速度较快的不同菌落,用接种环平板划线法多次纯化于新的不含有有机碳源的固体培养基上至纯培养。本研究通过稀释平板法初步分离纯化到25株固碳细菌,选取优势菌进行固碳功能复筛(参照实施例2),并挑取其中效果最佳的1株作为研究对象。利用扫描电镜确定该菌株菌体形态为杆状(图1),其在固体培养基上产生的菌落小,呈脐状,白色,不透明,表面光滑黏稠,边缘不规则(图2)。

[0038] 3、进一步对该菌株进行16S rRNA测序:采用通用引物27F:5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG-3'(SEQ ID NO.2)和1492R引物:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'(SEQ ID NO.3)对菌株的基因组DNA进行PCR扩增,然后将扩增产物进行测序,测序结果如SEQ ID NO.1所示。然后,利用NCBI数据库,根据菌株16S rRNA基因序列进行BLAST分析,并构建系统发育树,由图3可见,分离得到的菌株与Enterobacter asburiae的遗传进化距离最近,其16S rRNA基因序列与肠杆菌属(Enterobacter sp.)同源,与Enterobacter asburiae NJBB9同源性显示为99.78%,结合其菌体形态和菌落特征,将该菌株鉴定为肠杆菌属(Enterobacter sp.)。但是,仅通过16S rRNA基因测序分析不能确定该菌株的准确分类。进一步地,对其进行全基因组测序:将提取的全基因组送至上海派森诺生物科技股份有限公司进行二代测序,将得到的序列结果与NCBI数据库中参考菌株的全基因组序列Enterobacter asburiae 17Nkhn-UP2进行平均核苷酸一致性(ANI)分析,当ANI值大于95%时,则可认为两者为同一菌种。然而ANI结果显示为88.38%,表明该菌株并非此物种,16S rRNA基因序列分析由于不能充分反映物种间的遗传差异而对细菌分类的判断是不够准确的。因此,通过比较该菌株与多个菌株全基因组序列的ANI值,我们发现该菌株与Enterobacter huaxiensis 090008的全基因组序列的ANI结果显示为98.86%,从而确定该菌株为Enterobacter huaxiensis。

[0039] 实施例2固碳菌肠杆菌Enterobacter huaxiensis GD-13的固碳酶活性

[0040] 1、材料与方法

[0041] 1.1供试菌株:肠杆菌(Enterobacter huaxiensis)GD-13,由实施例1分离并鉴定。

[0042] 1.2肠杆菌(Enterobacter huaxiensis)GD-13RubisCO固碳酶活性检测

[0043] 为研究肠杆菌(Enterobacter huaxiensis)GD-13的固碳能力,挑取实施例1中不含有有机碳源的固体培养基中纯化出的菌落,接种到10mL不含有有机碳源的液体培养基中,28℃、160r/min、培养5天。取培养结束时的菌液进行RubisCO酶活性测定,利用北京博奥森生物技术有限公司提供的二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCO)试剂盒进行测定,同时采用BCA蛋白浓度测定试剂盒测量菌液总蛋白含量,对RuBisCO酶活性测定结果进行标准化,具体测量方法参照试剂盒说明书,测定结果见图4。本实施例为突出肠杆菌(Enterobacter huaxiensis)GD-13的较强固碳能力,采用实施例1中分离纯化到的另外4株固碳菌进行对比研究。

[0044] 1.3数据处理

[0045] 本实验原始数据采用Microsoft Excel Office 2016软件进行初步整理。实验结果采用Graphpad Pism 9.5进行绘图。

[0046] 2、结果与分析

[0047] 肠杆菌 (*Enterobacter huaxiensis*) GD-13 的固碳能力如图4所示,其RuBisCO酶活性约为17.02U/mg prot,远大于其他4株固碳菌,表明其具有较好的固碳能力。

[0048] 实施例3固碳菌肠杆菌 *Enterobacter huaxiensis* 在不同条件下的固碳能力研究

[0049] 1、材料与方法

[0050] 1.1供试菌株:肠杆菌属 (*Enterobacter huaxiensis*),由实施例1分离并鉴定。

[0051] 无碳液体培养基:Na₂HPO₄,0.5g/L;KH₂PO₄,0.5g/L;MgSO₄,0.3g/L;CaCl₂,0.2g/L;NH₄Cl,0.5g/L;NaNO₃,0.25g/L;NaCl,0.4g/L;微量元素溶液,10mL/L;pH 7.0。所述微量元素溶液的配方为:FeCl₂,0.3g/L;FeSO₄·7H₂O,0.3g/L,MnSO₄·H₂O,0.15g/L;ZnSO₄·7H₂O,0.25g/L;CoCl₂,0.2g/L。

[0052] Na₂CO₃液体培养基:在无碳液体培养基的基础上添加Na₂CO₃,0.63g/L。

[0053] NaHCO₃液体培养基:在无碳液体培养基的基础上添加NaHCO₃,0.5g/L。

[0054] NaNO₂液体培养基:NaNO₂,4.6g/L;Na₂HPO₄,0.5g/L;KH₂PO₄,0.5g/L;MgSO₄,0.3g/L;CaCl₂,0.2g/L;NaHCO₃,0.5g/L;NH₄Cl,0.5g/L;NaNO₃,0.25g/L;NaCl,0.4g/L;pH 7.0。

[0055] Na₂S₂O₃液体培养基:将NaNO₂液体培养基中NaNO₂,4.6g/L替换为Na₂S₂O₃,5g/L。

[0056] 1.2肠杆菌 *Enterobacter huaxiensis* 在不同无机碳源及不同电子供体下的固碳能力研究

[0057] 挑取实施例1中不含有机碳源的固体培养基中纯化出的菌落,接种到5mL无碳液体培养基中,28℃、160r/min、培养5天后取400μL分别接种到5mL无碳液体培养基、Na₂CO₃液体培养基、NaHCO₃液体培养基、NaNO₂液体培养基和Na₂S₂O₃液体培养基中,并做3个平行,28℃培养5天后检测菌液中菌株丰度。微生物丰度具体测量方法如下:将SYBR-Green (10000×,索莱宝) 稀释100倍后,与碘化丙啶 (PI,索莱宝) 按50:1 (SYBR-Green:PI,V:V) 混合后获得荧光染料。将1mL菌液通过300目尼龙筛网去除大颗粒杂质后,加入10μL荧光染料避光染色15min,涡旋后进行检测以确定活菌数量。

[0058] 1.3数据处理

[0059] 本实验数据在CytExpert SRT软件中对数据进行分析后采用Microsoft Excel Office 2016软件进行初步整理。实验结果采用Graphpad Pism 9.5进行绘图。

[0060] 2、结果与分析

[0061] 由于在菌株培养过程中,其可利用的碳源只有大气二氧化碳和培养基中的无机碳源,所以菌株生物量的增加都是来自于菌株固碳所得。肠杆菌 *Enterobacter huaxiensis* 在不同条件下固碳能力的实验结果见图5。结果表明,在仅有大气二氧化碳的情况下培养5天后,肠杆菌 *Enterobacter huaxiensis* 的菌株浓度仅为2267.01Events/μL,表明其对大气二氧化碳具有较弱的固定能力。当外加无机碳源时,菌株浓度升高,表明其固碳能力有所提高,可能是菌株通过其他途径固碳的结果。而其对两种不同形式的无机碳源的利用相差较大,其菌株浓度在NaHCO₃、Na₂CO₃添加下分别增加至约4.5倍和12.7倍。当外加电子供体时,菌株固碳能力进一步提升,相比于仅添加NaHCO₃,外加NaNO₂和Na₂S₂O₃时其菌株浓度再次增加约2.7倍和3.0倍,说明电子供体能为菌株固碳提供更多能量,而Na₂S₂O₃对菌株固碳能力的提升效果更好。结果表明该菌株能够在极低营养的盐类培养基中生长,且其生长活性和固碳能力可受电子供体驱动,同时其在碳酸盐含量较高的土壤环境中具有更高的固碳潜力,这有助于开发菌株在特殊环境(如岩溶土壤)中的应用。

[0062] 实施例4固碳菌肠杆菌*Enterobacterhuaxiensis* GD-13的固碳途径分析

[0063] 1、材料与方法

[0064] 将由实施例1分离并鉴定的肠杆菌*Enterobacter huaxiensis* GD-13送至上海派森诺生物科技股份有限公司,使用IlluminaNovaseq平台进行二代测序,组装拼接出全基因组框架图,使用生物信息学软件和数据库对细菌进行注释和功能鉴定,通过KEGG数据库推测菌株GD-13的固碳途径,为研究菌株固碳能力提供依据。

[0065] 2、结果与分析

[0066] 基于KEGG数据库,分析了菌株GD-13的CO₂固定路径。首先乙酰辅酶A和CO₂在丙酮酸铁氧化还蛋白氧化还原酶作用下生成丙酮酸,并通过磷酸烯醇丙酮酸合成酶形成磷酸烯醇式丙酮酸从而固定CO₂生成草酰乙酸,在天冬氨酸转氨酶作用下生成L-天冬氨酸,进而转化为苏氨酸,苏氨酸被苏氨酸醛缩酶裂解成甘氨酸,而甘氨酸再由甘氨酸羟甲基转移酶生成丝氨酸,最终在丝氨酸脱氢酶作用下转化为丙酮酸形成固碳循环(图6)。该途径固定CO₂时最先产生的稳定产物是四碳化合物草酰乙酸,经过多种氨基酸的转化,最终实现磷酸烯醇式丙酮酸的更新,且在该循环中苏氨酸的合成和降解是核心过程。此外,当固定CO₂产生草酰乙酸时,草酰乙酸在苹果酸脱氢酶的催化下生成苹果酸,苹果酸又在苹果酸酶的催化下直接转化为丙酮酸完成固碳循环。同时,菌株GD-13还拥有固碳效率较高的酶——乙酰辅酶A羧化酶(ACC),催化乙酰辅酶A与HCO₃⁻生成丙二酰辅酶A的反应,这一定程度上解释了无机碳源NaHCO₃的添加使该菌株固碳能力升高的现象。

[0067] 实施例5固碳菌肠杆菌*Enterobacterhuaxiensis* GD-13溶磷能力研究

[0068] 1、材料与方法

[0069] 1.1供试菌株:肠杆菌GD-13,由实施例1分离并鉴定。

[0070] Pikovskaya液体培养基:酵母提取物,0.5g/L;葡萄糖,10g/L;Ca₃(PO₄)₂,5g/L;(NH₄)₂SO₄,0.5g/L;KCl,0.2g/L;Mg₃(PO₄)₂,0.1g/L;MgSO₄,0.0001g/L;FeSO₄,0.0001g/L;pH 7.0。

[0071] 1.2固碳菌肠杆菌GD-13溶磷能力检测

[0072] 将5g/L的KH₂PO₄标准液稀释为0、2、2.5、250、500、1000mg/L浓度,采用钼锑抗显色法测定吸光度,经测定得到标准曲线方程为 $y=0.0028x+0.048$,R²=0.9996。

[0073] 取实施例1中不含有机碳源的固体培养基中纯化出的菌落,接种到10mL Pikovskaya液体培养基中,28℃、160r/min、培养5天,设置不接种菌株的对照组,培养结束时将菌液离心后,向菌体沉淀加入1mL无菌水利用组织破碎仪研磨后与上清液混合,并加入NaHCO₃后振荡过滤,采用钼锑抗显色法测定其有机磷含量,测定结果见图7。本实施例为突出肠杆菌GD-13的较强溶磷能力,采用实施例1中分离纯化到的另外4株固碳菌进行对比研究。

[0074] 1.3数据处理

[0075] 本实验数据采用Microsoft Excel Office 2016软件进行初步整理。实验结果采用Graphpad Pism 9.5进行绘图。

[0076] 2、结果与分析

[0077] 通过以溶解磷酸三钙的能力为指标,确定该肠杆菌GD-13具有解磷能力,实现了对难溶性磷酸盐的利用。其溶磷能力为407.32mg/L,而其他4株固碳菌的溶磷能力最低至

115.18mg/L,最高仅301.25mg/L,均低于该固碳菌。

[0078] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

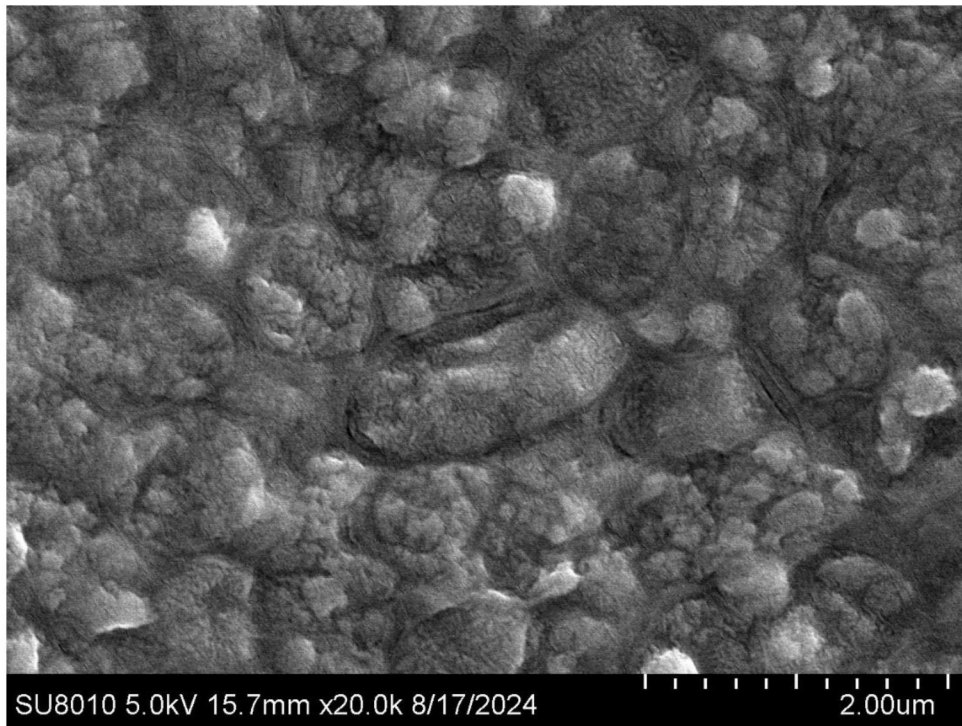


图1



图2

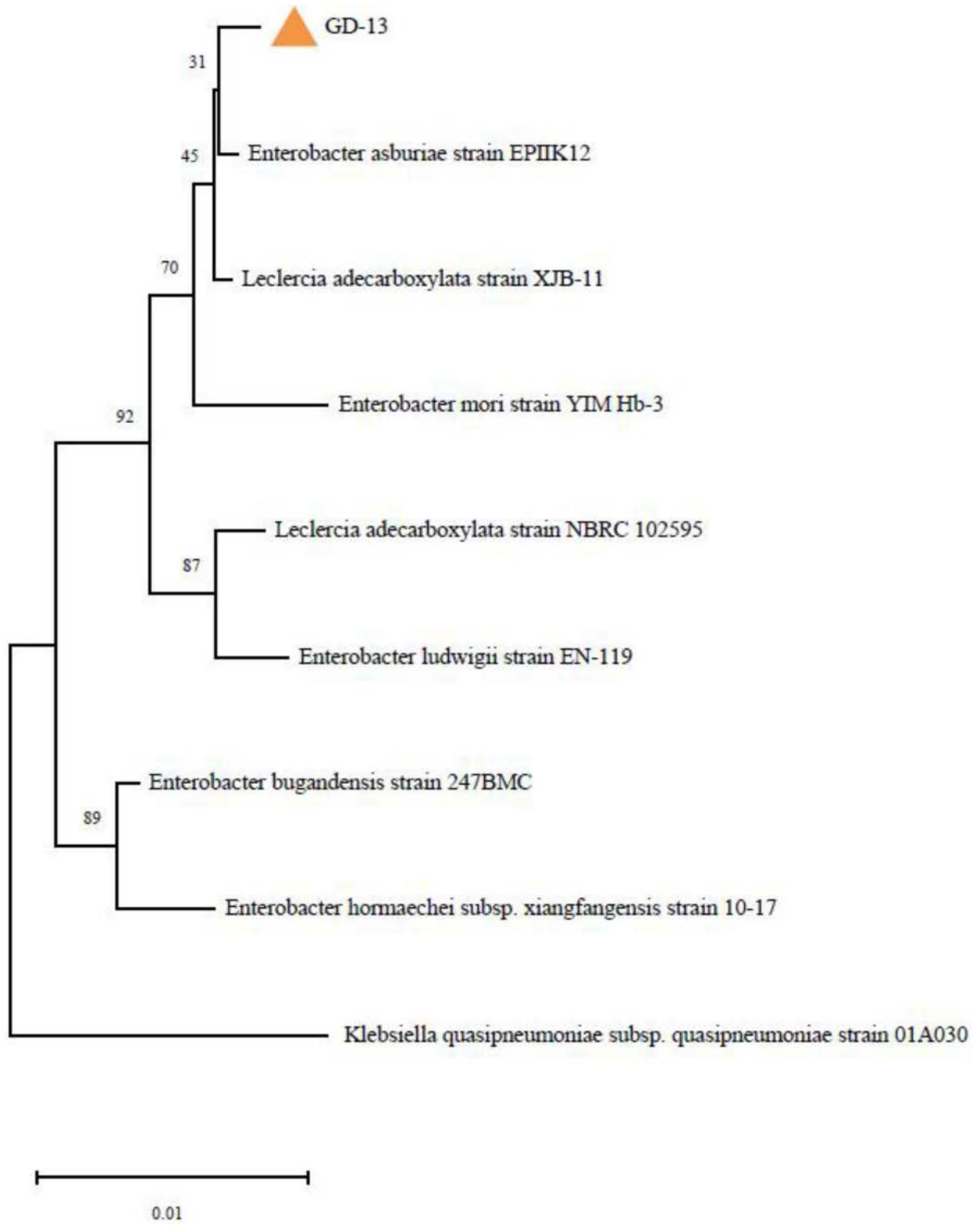


图3

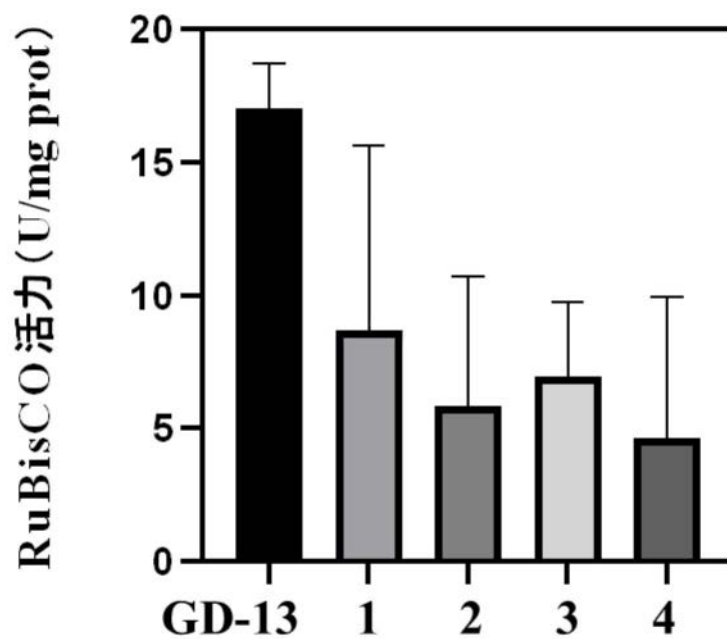


图4

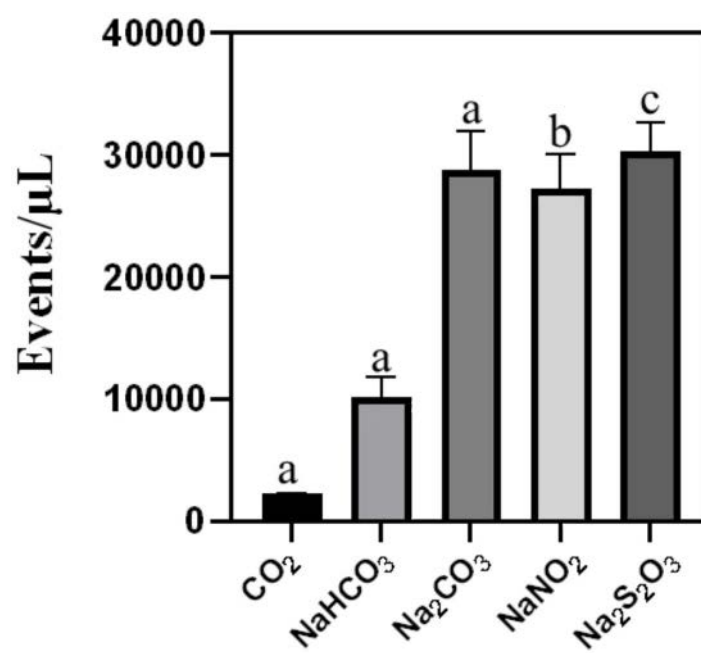


图5

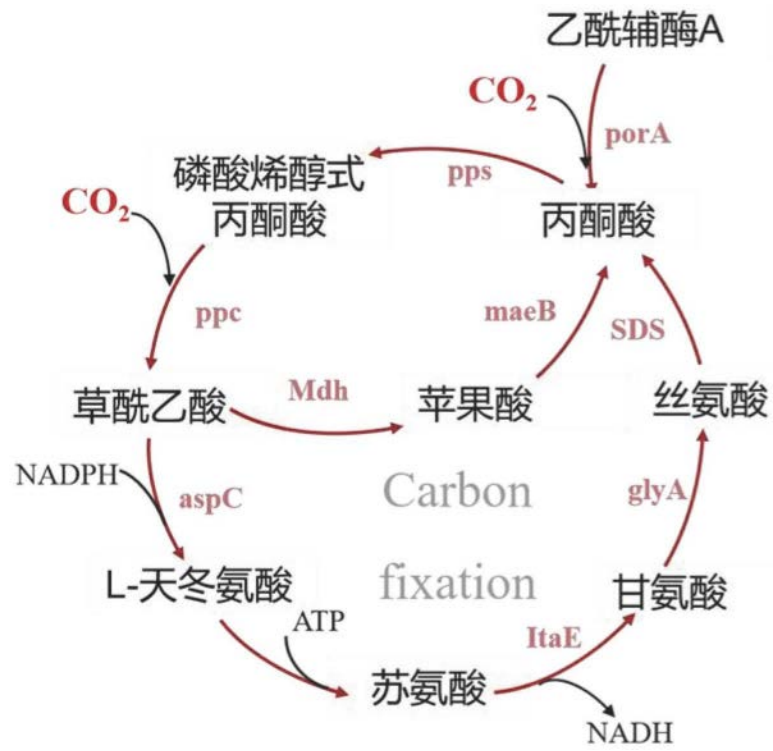


图6

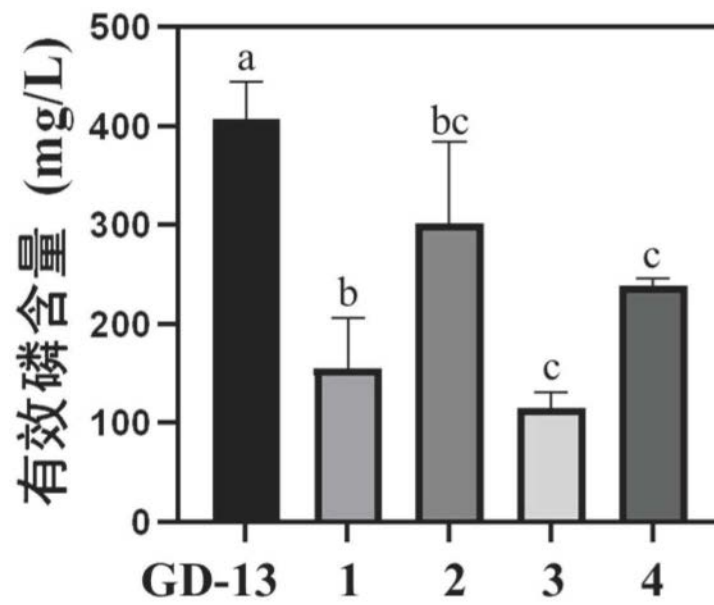


图7