

文章编号: 1674-7054(2016)02-0259-06

## 解磷菌 YYF-3 的分离鉴定及其生长特征

朱金峰<sup>1</sup>, 孙会忠<sup>2</sup>, 王小东<sup>2</sup>, 李广良<sup>1</sup>, 孙明辉<sup>1</sup>, 陈冲<sup>1</sup>, 陈启龙<sup>1</sup>

(1. 河南省烟草公司 漯河市公司, 河南 漯河 462000; 2. 河南科技大学 农学院, 河南 洛阳 471003)

**摘要:** 通过富集培养和鉴别培养初筛, 从烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 根际土壤分离到1株具有较高解磷活性的菌株, 编号为YYF-3。菌株YYF-3经过48 h发酵后, 培养基上清液中游离态磷含量达到 $221.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 进一步确定YYF-3均具有较强的解磷能力。形态特征观察、生化特性测定和16S rDNA序列分析的多相分类鉴定结果表明, 菌株YYF-3隶属于不动杆菌属 *Acinetobacter*, 暂命名为 *Acinetobacter* sp. YYF-3。菌株YYF-3最适生长温度为 $28 \sim 34^\circ\text{C}$ , 最适pH值范围是 $6.0 \sim 6.5$ , 对NaCl反应敏感。菌株YYF-3既可以作为解磷菌微生物诱变育种和全基因组育种的良好材料, 也可以作为烤烟专用菌肥复配的备用菌株。

**关键词:** 解磷菌; 分离; 鉴定; 生长特性

**中图分类号:** S 182

**文献标志码:** A

**DOI:** 10.15886/j.cnki.rdsxb.2016.02.020

磷是植物生长发育过程中的肥料三要素之一, 其在植物体中的含量仅次于氮和钾。通常土壤有效磷小于 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时被认为是缺磷土壤, 我国耕地缺磷土壤面积超过总耕地面积的74%<sup>[1-2]</sup>。因此, 我国绝大部分耕地为了实现高产、稳产、优质的生产目标, 均需补充大量的磷化肥, 但长期施肥磷化肥形成的富集效应, 又造成了土壤本底理化特性的改变, 如板结、元素供应失衡、微生物群落失调等一系列生产、生态负面效应。难溶性磷酸盐是土壤中绝大部分磷主要的存在形式, 植物不能直接吸收利用<sup>[3]</sup>。为满足生产需要, 如何改善和提高耕地土壤磷的利用率, 仍然是一项亟待解决的农业技术课题<sup>[4]</sup>。众所周知, 微生物在磷元素物质循环过程中的合成与分解途径中起着非常重要的作用<sup>[2,3]</sup>, 一些具有解磷功能微生物已经得到证实, 但就整体而言, 关于解磷微生物的研究仍然不够深入和系统, 解磷菌资源相对单一, 使相关的微生物诱变育种、工程菌构建等下游技术研究受到一定的限制, 故持续筛选分离解磷菌株仍然是人们需要投入和关注的优先选项<sup>[5]</sup>。不同菌株在不同土壤环境的定殖能力存在差异, 为了筛选出适宜于烟草根际环境繁殖的解磷菌, 以丰富烟草专用菌肥开发微生物资源, 笔者以烤烟根际土壤为材料, 对解磷菌进行了筛选鉴定, 并对目标菌株的生长特性进行了探索。

### 1 材料与方法

**1.1 试验材料** 土壤样品采自河南省漯河市烟草公司的烤烟生产试验田, 烤烟品种为豫烟10号。

**富集培养基:** 葡萄糖 $5.0 \text{ g}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0.5 \text{ g}$ , NaCl  $5 \text{ g}$ , KCl  $0.3 \text{ g}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.3 \text{ g}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $0.03 \text{ g}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $0.03 \text{ g}$ ,  $\text{CaCO}_3$   $4 \text{ g}$ ,  $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$   $0.5 \text{ g}$ , 鸡蛋黄  $10 \text{ mL}$ , 蒸馏水定容至 $1000 \text{ mL}$ , pH7.0。

**分离培养基:** 葡萄糖 $5.0 \text{ g}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0.5 \text{ g}$ , NaCl  $0.5 \text{ g}$ , KCl  $0.3 \text{ g}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.3 \text{ g}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $0.03 \text{ g}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $0.03 \text{ g}$ , 鸡蛋黄  $10 \text{ mL}$ , 菊糖  $1.0 \text{ g}$ , 琼脂粉  $18.0 \text{ g}$ , 蒸馏水定容至 $1000 \text{ mL}$ , pH7.0。

**磷细菌液体培养基:** 葡萄糖 $5 \text{ g}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $0.5 \text{ g}$ , NaCl  $0.3 \text{ g}$ , KCl  $0.3 \text{ g}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.3 \text{ g}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $0.03 \text{ g}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$   $0.03 \text{ g}$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$   $8 \text{ g}$ , 蒸馏水定容至 $1000 \text{ mL}$ , pH7.0。

收稿日期: 2015-07-26

基金项目: 河南省烟草公司科技项目(HYKJ2012M04, HYKJ201302); 上海烟草集团有限责任公司项目(SZB-CW2014-00830); 河南科技大学博士科研启动基金(4024-13480045)

作者简介: 朱金峰(1979-), 男, 农艺师。研究方向: 烟草栽培。E-mail: huizhong66@163.com

通信作者: 孙明辉(1969-), 男, 农艺师。研究方向: 烟草栽培。E-mail: lylhsys@126.com

LB 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 5 g, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH 7.0。

## 1.2 方法

### 1.2.1 解磷菌的筛选方法

1.2.1.1 富集培养 称取 5 g 土样放入装有 45 mL 富集培养基的三角瓶中, 30 °C, 160 r · min<sup>-1</sup> 摇床培养 48 h。

1.2.1.2 分离培养 将富集培养液以 10 倍的梯度从 10<sup>-1</sup> 稀释至 10<sup>-4</sup>。无菌操作条件下分别取 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup> 3 个稀释度的稀释液 0.1 mL, 涂布于解磷菌分离培养基, 于 30 °C 恒温培养 4 d。用接种环挑取生长良好、特征典型、解磷圈大而显著的单菌落, 在分离培养基平板上划线纯化, 获得目标菌株活体纯培养物, 并 4 °C 斜面保存。

1.2.2 解磷菌株的解磷能力确定 采用钼蓝比色法, 操作步骤参考文献 [7] 进行。

### 1.2.3 菌株的鉴定

1.2.3.1 菌株的生化指标测定 参考文献 [8-9] 进行。

1.2.3.2 菌株的 16S rDNA 分析 将 YYF-3 菌株接种于 LB 液体培养基, 30 °C, 180 r · min<sup>-1</sup> 摇床培养 18 h, 获取菌液。采用 TaKaRa MiniBEST Bacterial Genomic DNA Extraction kit Ver. 2.0 试剂盒提取 YYF-3 总 DNA。

PCR 扩增引物为: 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物: 1492R: 5'-TAGGGTTAC-CTTGTACGACTT-3'。PCR 扩增体系 (20 μL): 10 × Ex Taq PCR buffer 2 μL, dNTP (10 mol · L<sup>-1</sup>) 1.6 μL, 正、反向引物 (20 mmol · L<sup>-1</sup>) 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, Ex Taq DNA 聚合酶 0.2 μL, 双蒸水 13.2 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 50 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 1 min 40 s, 循环 30 次; 72 °C 最终延伸 10 min。目的片段长度约为 1.5 kb, PCR 产物经过 1% 琼脂糖凝胶电泳, 目的条带采用 TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction kit Ver. 3.0 进行胶回收, 回收产物与 TaKaRa pMDTM18-T Vector 连接, 并将重组质粒转化于 DH5α 感受态细胞, 37 °C 培养过夜, 经蓝白斑筛选, 挑选阳性克隆摇菌, 测序由北京奥克鼎盛生物科技有限公司完成。

将测序获得的 YYF-3 的 16S rDNA 碱基序列提交 NCBI 进行相似性比对, 并采用 MEGA6.06 软件的 Neighbor-Joining 方法构建系统发育进化树。菌株鉴定参考文献 [10-11] 的方法进行。

## 1.3 菌株 YYF-3 的生长特性观察

1.3.1 温度对生长的影响 将 YYF-3 以 2% (菌悬液 OD<sub>600</sub> = 0.2) 的接种量接入磷细菌液体培养基中, 分别置于 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44 °C, 180 r · min<sup>-1</sup> 培养 48 h, 用分光光度计测定 600 nm 波长的菌体 OD 值 (重复 3 次取平均值, 下同)。

1.3.2 pH 对生长的影响 分别将磷细菌液体培养基 pH 调为 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 和 8.5, 将 YYF-3 以 2% (菌悬液 OD<sub>600</sub> = 0.2) 的接种量接入, 30 °C, 180 r · min<sup>-1</sup> 培养 48 h, 用分光光度计测定 600 nm 波长的菌体 OD 值。

1.3.3 NaCl 对生长的影响 将 YYF-3 按 2% (菌悬液 OD<sub>600</sub> = 0.2) 的接种量分别接入 NaCl 含量 (0, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 4.0, 7.0 和 10.0 g · L<sup>-1</sup>) 不同的磷细菌液体培养基中, 30 °C, 180 r · min<sup>-1</sup> 培养 48 h, 用分光光度计测定 600 nm 波长的菌体 OD 值。

## 2 结果与分析

2.1 解磷菌株的获得 通过富集和平板分离培养, 获得 2 株溶磷圈大而显著的菌株 (图 1), 判断具有解磷活性, 初步确定为目标菌株, 菌株编号分别为 YYF-7, YYF-3。

2.2 解磷菌株的解磷能力 采用钼锑抗比色法对 YYF-7 和 YYF-3 的解磷能力进行了评估与确定。结果表明, YYF-7 和 YYF-3 经过 48 h 发酵后, 二者培养基上清液中游离态磷含量分别为 39.6 mg · L<sup>-1</sup> 和 221.7 mg · L<sup>-1</sup> (二者的对照处理分别为 4.7 mg · L<sup>-1</sup> 和 5.6 mg · mL<sup>-1</sup>), 说明 YYF-7 和 YYF-3 均具有解磷能力, 但 YYF-3 的解磷活性显著高于 YYF-7, 约是 YYF-7 的 5.6 倍, 故将 YYF-3 作为鉴定菌株。

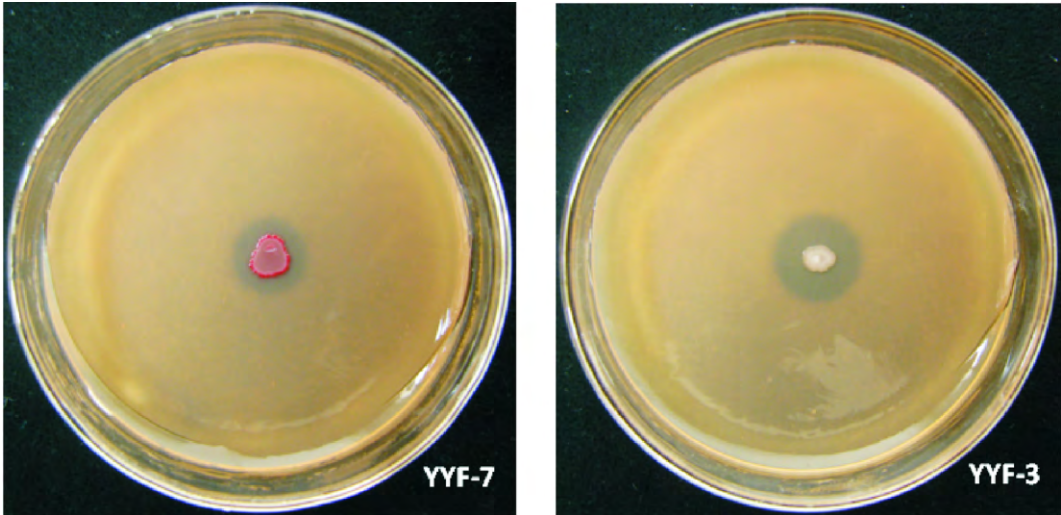


图 1 菌株的磷降解圈示意图

Fig. 1 The phosphorate degradation circle of the strains

2.3 菌株 YYF-3 的多相分类特征

2.3.1 菌落特征 从图 2 可知,菌株 YYF-3 为球杆菌,菌体长 1.0 ~ 1.4 μm、宽 1.3 ~ 2.0 μm(图 2-A)。常成对排列,也可单个存在,有时也可呈链状。具荚膜,无鞭毛,不能运动,在 LB 平板上菌落边缘整齐,微润,有光泽,低凸起,乳白色(图 2-b)。

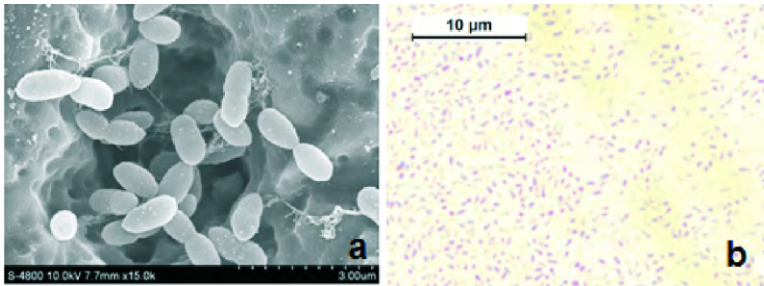


图 2 菌株 YYF-3 形态的显微观察

a. 扫描电镜照片, ×15 000; b. 光镜照片, ×1 000

Fig. 2 Microscopic observation of the morphology of the strain YYF-3

a: Scanning electron micrography, ×15 000; b: light microscopy, ×1 000

2.3.2 生化特征 YYF-3 菌株的生理生化测定结果表明,生化特征与文献 [10 - 11] 中对不动杆菌属 *Acinetobacter* 相关特征的描述基本一致(表 1)。

表 1 YYF-3 菌株的生理生化指标测定结果

Tab. 1 Physiological and biochemical indexes of the strain YYF-3

| 测定项目                       | 结果     | 测定项目                                   | 结果     |
|----------------------------|--------|----------------------------------------|--------|
| Test                       | Result | Test                                   | Result |
| 革兰氏染色 Gram staining        | —      | 脲酶试验 Urease test                       | —      |
| 葡萄糖发酵 Glucose fermentation | —      | 赖氨酸脱羧酶反应 Lysine decarboxylase reaction | —      |
| 明胶反应 Gelatin reaction      | —      | 触酶试验 Contact enzyme test               | +      |
| 戊二酸盐反应 Glutarate reaction  | —      | 氧化酶试验 Oxidase test                     | —      |
| 硝酸盐反应 Nitrate reaction     | —      | 丙二酸利用 Malonate utilization             | +      |

注 “+”表示阳性 “-”表示阴性  
Noted “+” show positive “-” show negative

2.3.3 16S rDNA 分析测序 通过对 YYF-3 菌株 PCR 产物阳性克隆的测序,获得 1 441 bp 的 16S rDNA 基因序列(图 3)。

```

1   AGAGTITGAT CCIGGCTCAG AITGAACGCT GGCGGCAGGC ITAACACAIG CAAAGTCGAGC
61  GGAGAGAGGT AGCTTGCTAC CGATCTTAGC GGCGGCAGGC IGAGTAAATG TIAGGAAICT
121 GCCIAITAGT GGGGACAAAC AITTCGAAAG GAATGCTAAT ACCGCAIACG ICCTIACGGGA
181 GAAAGCAGGG GAITCTTCGA CCTTGCCTTA ATAGAIGAGC CTAAGTCGGA TIAGCTIAGTI
241 GGIGGGGTAA AGGCCTACCA AGGCGACGAT CTGTAGCGGG ICTGAGAGGA TGAICCGCCA
301 CACTGGGACT GAGACACGGC CCAGACTCCT ACCGCGAGCA GCAGTGGGGA ATATTGGACA
361 ATGGGCGCAA GCTTGAICCA GCCATGCCGC GTGTGTGAAG AAGGCCITAT GGTITGTAAG
421 CACTTTAAGC GAGGAGGAGG CTACTGAAAT TAATACCTTC AGATAGTGA CATTIACGCG
481 AGAATAAGCA CCGGCTAACT CTGTGCCAGC AGCGCGGCTA ATACAGAGGG TCGAAGCGTI
541 AATCGGATTT ACTGGGCGTA AAGCGCGCCT AGCGGCTTAA ITAAGTCAA TGTGAAATCC
601 CCGAGCTTAA CTTGGGAAIT GCATTCGATA CTGGTTAGCT AGAGTGTGGG AGAGGAATGT
661 AGAATTCAG GTGTAGCGGT GAAATGCGTA GAGATCTGGA GGAATACCGA TGGCGAAGGC
721 AGCCATCTGG CTTAACACTG ACCTGTAGGT GCGAAAGCAT GGGGAGCAAA CAGGATTAGA
781 TACCTTGGTA GTCCATGCCG TAAACGATGT CTACTAGCCG TTGGGGCCTT TGAAGCTTAA
841 GTGGCGCAGC TAACGCGATA AGTAGACCCG CTGGGGAGTA CGGTGCGAAG ACTAAAATC
901 AAAATGAATG ACGGGGGCCC GCACAAGCGG TGGAGCAATG GGTITTAATC GATGCAACGC
961 GAAGAACCIT ACCTGGCCTT GACATAGTAA GAATTTTCCA GAGATGGATT GTTGGCTTGC
1021 GGAACCTTACA TACAGGTGCT GCATGGCTGT CTTAGCTTGG TGTGTGAGA TGTGTGGTAA
1081 AGTCCCGCAA CGAGCGCAAC CCTTTTCTTT ATTTGCCAGC GAGTAAATGC GGGAACTTAA
1141 AGGATACTGC CAGTGACAAA CTGGAGGAAG GCGGGGACGA CGTCAAGTCA TCAITGCCCT
1201 TACGGCCAGG GCTACACAGG TGTACAAATG GTGGGTACAA AGGGTTGCTA CCTIAGCGATA
1261 GGAATGCTAAT CTCAAAAAGC CGATCGTAGT CCGGATTTGA GTCTGCAACT CGACTCCAAG
1321 AAGTCCGAAI CGCTAGTAAI CGCGGATCAG AATGCCGCGG TGAATACGTT CCCGGGCTTT
1381 GTACACACCG CCGGTACACG CATGGGAGTT TGTTCACCA GAAATAGCTA GCTTAACTGC
1441 AAAGAGGGCG GTTACCACGG TGTGGCGGAT GACTGGGGTG AATCGCTAAC AAGGTAAACC
  
```

图 3 YYF-3 菌株的 16S rDNA 基因序列

Fig. 3 The 16S rDNA gene sequence of the strain YYF-3

通过 NCBI 的 blast 在线分析功能对以上序列(图 3)进行同源性比对,选取同源性较高的序列采用 MEGA6.06 软件构建菌株的 Neighbor-Joining 系统发育进化树。从图 4 可知,菌株 YYF-3 分别与 *A. Septicus* (NR116071.1), *A. Septicus* (NR116070.1), *A. Tandoii* (NR117630.1), *A. baumannii* (NR116845.1) 和 *A. baumannii* (NR117620.1) 共同聚为一支,且 Bootstrap 自举值达到 99%。综合培养特征、生理生化分析和 16S rDNA 序列比对结果,确定 YYF-3 隶属于不动杆菌属 *Acinetobacter*, 暂命名为 *Acinetobacter* sp. YYF-3。

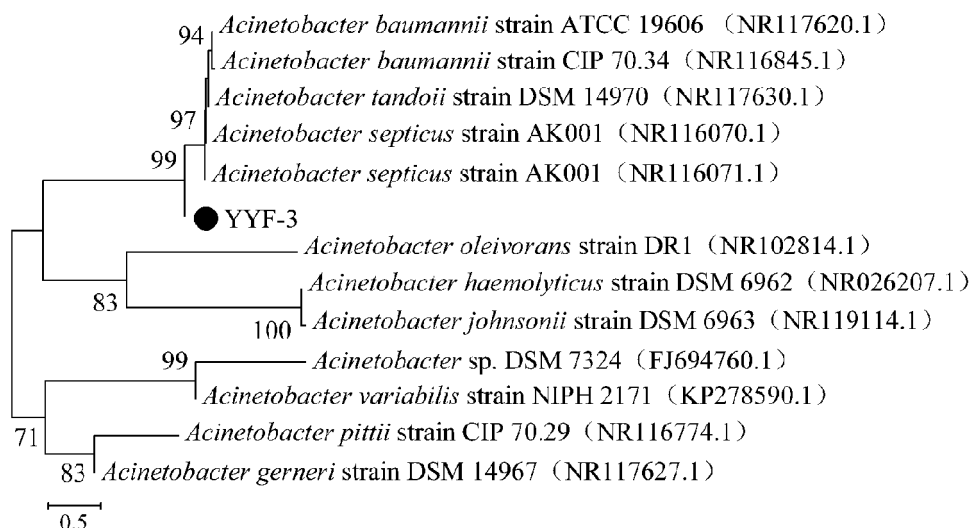


图 4 菌株 YYF-3 的 Neighbor-Joining 系统发育树

Fig. 4 The Neighbor-Joining phylogenetic tree of the strain YYF-3

## 2.4 菌株的生长特性

2.4.1 温度对菌株生长的影响 从图 6 可知,在低于 20 ℃ 和高于 38 ℃ 的条件下, $OD$  值很低,而且增长和下降幅度都很小,说明菌株 YYF-3 在此温度条件下几乎不进行生长;从 22 ℃ 开始, $OD$  值开始由低到快速增长,32 ℃ 时  $OD$  值达到最大值,温度大于 38 ℃ 时, $OD$  值则由高到低迅速减小,并维持低位,可见菌株 YYF-3 的基本生长温度范围为 22 ~ 38 ℃;菌株在 28 ℃ 前  $OD$  值上升速度快,增长幅度大,温度介于 28 ~ 34 ℃ 时, $OD$  值维持维持在高值状态,且变化幅度较小,34 ℃ 后  $OD$  值则迅速下降,表明菌株适宜的生长温度范围为 28 ~ 34 ℃。

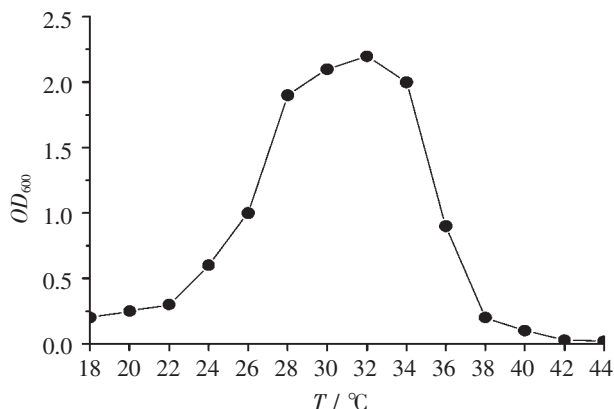


图 5 温度对菌株 YYF-3 生长的影响

Fig.5 The effect of temperature on the growth of the strain YYF-3

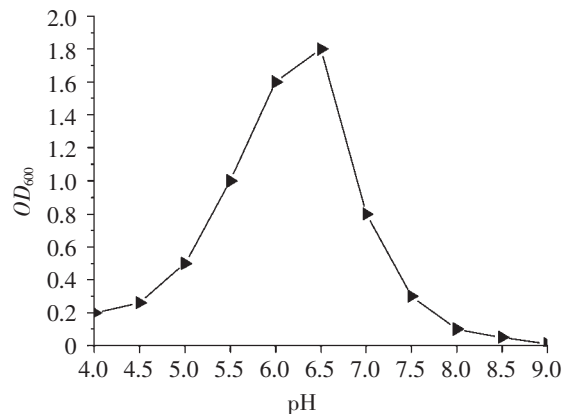


图 6 pH 对菌株 YYF-3 生长的影响

Fig.6 The effect of pH on the growth of the strain YYF-3

2.4.2 pH 对菌株生长的影响 从图 5 可知,pH 在 4.5 ~ 6.5 范围时, $OD$  值由低到高迅速增大,大于 7.5 时, $OD$  值则迅速减小并维持低位,所以菌株的基本生长 pH 值范围为 4.5 ~ 7.5; pH 在 6.5 时, $OD$  值最大,但同时也是  $OD$  值由大变小最明显的拐点,这说明菌株 YYF-3 对偏酸性条件适应能力较好,碱性环境不利于其生长; pH 值介于 6.0 ~ 6.5 时, $OD$  值维持在高位状态,表明菌株适宜的 pH 值范围为 6.0 ~ 6.5。

2.4.3 NaCl 含量对菌株生长的影响 从图 6 可知,当 NaCl 含量低于  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, $OD$  值介于 1.0 ~ 1.2 之间,说明菌株 YYF-3 生长良好; NaCl 含量在  $1 \sim 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  范围菌株能够生长,但  $OD$  值大小与 NaCl 含量呈负相关; NaCl 含量大于  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,菌株 YYF-3 即不能生长,说明菌株适于在低盐环境生长。

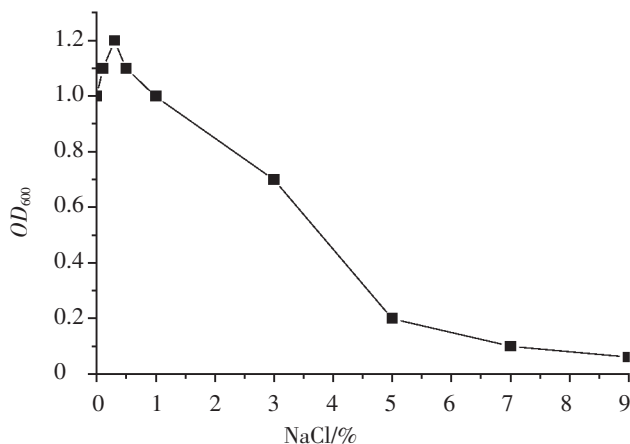


图 7 NaCl 对 YYF-3 菌株生长的影响

Fig.7 The effect of NaCl on the growth of the strain YYF-3

## 3 讨论

解磷菌在实际生产中已有应用<sup>[1]</sup>,但总体而言,解磷菌肥的开发和应用还不深入,野生解磷菌遗传资源相对贫乏,多样性不高。所以分离筛选更多的优良野生解磷菌资源仍然是一项重要的基础性工作。文献报道的解磷菌典型资源类群主要有:芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、肠细菌属(*Enterbacter*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、多硫杆菌属(*Thiobacillus*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、微球菌属(*Micrococcus*)等;解磷放线菌绝大部分为链霉菌属(*Streptom*);解磷真菌主要是曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)和根霉属(*Rhizopus*)<sup>[12-14]</sup>。本研究从烤烟根际土壤中分离筛选出的菌株 YYF-3 经过 48 h 发酵后,培养基上清液中游离态

磷含量达到  $221.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 从解磷活性来看, 是一株具开发应用潜力优良菌种; 对菌株 YYF-3 进行多项分类鉴定的结果是隶属于不动杆菌属, 而不动杆菌属解磷菌株鲜见报道, 但不动杆菌是土壤中的常见优势菌群, 在土壤中具有较强的定殖能力, 这些特征有利于对菌种的后期开发利用。同时, 对菌株 YYF-3 尽管进行了形态、生理生化和 16S rDNA 等多方面的综合鉴定分析, 但还是未能很好的归属到种, 这也从一个侧面进一步说明了 YYF-3 菌株遗传背景的复杂性, 对其进行下游深入研究的空间大。

对菌株 YYF-3 生长特性的初步研究表明, 该菌株的生长温度适中、喜偏酸性环境, 耐盐性较差, 这为后续的菌肥菌的配伍、菌肥基质的选择、菌肥的应用范围等相关研究提供了基础数据。

## 参考文献:

- [1] 李海云, 孔维宝, 达文燕, 等. 土壤溶磷微生物研究进展 [J]. 生物学通报, 2013, 48(7): 1-5.
- [2] Behera B C, Singdevsachan S K, Mishra R R, et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising micro-organism in mangrove [J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2014, 3(2): 97-110.
- [3] 钟传青, 黄为一. 不同种类解磷微生物的溶磷效果及其磷酸酶活性的变化 [J]. 土壤学报, 2005, 42(2): 286-294.
- [4] 赵小蓉, 林启美, 李保国. 溶磷菌对 4 种难溶性磷酸盐溶解能力的初步研究 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 236-241.
- [5] Soma P, Swapan B, Hrishikesh C. Solubilization of tricalcium phosphate by P(3HB) accumulating *Azotobacter chroococcum* MAL-201 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(5): 1575-1582.
- [6] Iradhatullah R, Tutik K, Laode A, et al. Screening of fungal rot isolates from cocoa as phosphate-dissolving and their growth ability on three types of media [J]. Procedia Food Science, 2015(3): 104-111.
- [7] 许光辉, 郑洪光. 土壤微生物分析方法手册 [M]. 北京: 农业出版社, 1986: 168-171.
- [8] 黄亚东, 时小艳. 微生物实验技术 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2012: 198-216.
- [9] 范例. 微生物基础与实验技术 [M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2012: 167-187.
- [10] 陈瑜. 临床常见细菌、真菌鉴定手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 28-31.
- [11] 布坎南, 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册 [M]. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 603-607.
- [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] 王俊宏, 张蕊, 王梦亮. 解磷微生物在农业上的应用 [J]. 山西农业科学, 2010, 38(9): 86-88.
- [14] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展 [J]. 土壤肥料, 2001, 5(3): 7-11.

## Isolation and Identification of Phosphate Accumulating Strain YYF-3 and its Growth Characteristics

ZHU Jinfeng<sup>1</sup>, SUN Huizhong<sup>2</sup>, WANG Xiaodong<sup>2</sup>, LI Guangliang<sup>1</sup>, SUN Minghui<sup>2</sup>, CHEN Chong<sup>1</sup>, CHEN Qilong<sup>1</sup>

(1. Henan Tobacco Company Luohe Branch, Luohe, Henan 462000, China;

2. College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China)

**Abstract:** A bacterial strain with high phosphate solubilizing activity was isolated from rhizosphere soil of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by enrichment culture and was screen cultured for preliminary identification, and it was coded strain YYF-3. After 48 hr of fermentation the strain YYF-3 was found to contain  $221.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  of free phosphorus in the culture supernatant, which was further proved that this strain had higher phosphate solubilizing ability. Morphological observation, biochemical detection, and 16S rDNA sequence analysis showed the strain YYF-3 was grouped to the genus *Acinetobacter*, temporarily named *Acinetobacter* sp. The growth culture showed that the strains YYF-3 grew best under the temperature of  $28-34^\circ\text{C}$  with the optimum pH ranging from 6.0 to 6.5, and gave a sensitive response to NaCl. The strain YYF-3 can be used as good material for mutation breeding and whole-genome based breeding for phosphate solubilizing bacterial microbes, and can also be used as a standby strain for preparation of tobacco special biofertilizer.

**Keywords:** phosphate solubilizing strain; isolation; identification; growth characteristics