

## 研究报告

## 不动杆菌 PSB-K 解磷促生能力及全基因组测序分析

赵健淞<sup>1</sup>, 付若晗<sup>1</sup>, 王跃麟<sup>1</sup>, 赵鑫<sup>1</sup>, 张越<sup>1</sup>, 杨艳歌<sup>\*3</sup>, 孙冬梅<sup>\*1,2</sup>

1 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院 黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室, 黑龙江 大庆 163000

2 农业农村部 东北平原农业绿色低碳重点实验室, 黑龙江 大庆 163000

3 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176

赵健淞, 付若晗, 王跃麟, 赵鑫, 张越, 杨艳歌, 孙冬梅. 不动杆菌 PSB-K 解磷促生能力及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 199-218.

ZHAO Jiansong, FU Ruohan, WANG Yuelin, ZHAO Xin, ZHANG Yue, YANG Yange, SUN Dongmei. Phosphate-solubilizing and plant growth-promoting effects and whole genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* PSB-K[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 199-218.

**摘要:**【背景】土壤中的磷元素普遍以难溶性磷酸盐形式存在, 限制了植物对其直接吸收利用。解磷细菌能够将环境中难溶性磷酸盐转化为植物可吸收利用的磷形态, 对改善土壤磷素营养具有重要意义。【目的】分离并鉴定一株高效解磷细菌, 探究其解磷能力、促生效果及相关基因, 以期了解磷菌肥的研发提供优良的菌株资源及理论支持。【方法】从土壤中分离筛选具有明显解磷效果的解磷细菌, 通过生理生化特性和分子生物学技术对其进行鉴定。通过透明圈法和钼锑抗比色法评估其解磷能力; 通过单因素试验分析不同种类碳源、氮源及难溶性磷酸盐对菌株解磷效果的影响。进一步, 通过二代测序平台对菌株进行全基因组测序, 解析其基因组中与解磷及铁载体合成运输相关的基因组成情况。最后, 通过水培试验验证该菌株对植物的促生作用。【结果】经鉴定, 高效解磷细菌 PSB-K 为鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*), 其解磷指数达到 2.58。在碳源为葡萄糖、氮源为硝酸钾和难溶性磷酸盐为磷酸三钙时, 菌株展现出最佳解磷性能, 发酵液中可溶性磷含量高达 560.35  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。全基因组测序结果显示, 菌株 PSB-K 基因组全长为 3 983 883 bp, 包含 3 849 个编码基因, 其中涵盖了多种有机酸合成、磷酸盐转运及铁载体合成运输相关基因。水培试验结果表明, 施加菌株 PSB-K 对油菜幼苗叶片面积、植株鲜重和根系长度具有显著的促生作用, 最好的菌液浓度分别为  $2.50 \times 10^7$ 、 $2.50 \times 10^7$ 、 $1.25 \times 10^7$  CFU/mL, 分别较对照组提高了 72.15%、72.08%、

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA28030203)

This work was supported by the Strategic Leading Science and Technology Project of Chinese Academy of Sciences (XDA28030203).

\*Corresponding authors. E-mail: SUN Dongmei, sdmLzw@126.com; YANG Yange, yange8602@126.com

Received: 2024-03-04; Accepted: 2024-09-30; Published online: 2024-11-12

197.81%。【结论】菌株 PSB-K 表现出对多种难溶性磷酸盐均有溶解能力，并且其解磷性能受碳氮源种类显著影响。该菌株对油菜生长具有显著的促生作用，为微生物菌肥的开发提供了菌种资源。此外，全基因组数据为深入探究解磷菌的解磷机制及功能基因挖掘提供了重要参考。

关键词：解磷细菌；植物促生；不动杆菌；全基因组测序

## Phosphate-solubilizing and plant growth-promoting effects and whole genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* PSB-K

ZHAO Jiansong<sup>1</sup>, FU Ruohan<sup>1</sup>, WANG Yuelin<sup>1</sup>, ZHAO Xin<sup>1</sup>, ZHANG Yue<sup>1</sup>, YANG Yange<sup>\*3</sup>, SUN Dongmei<sup>\*1,2</sup>

1 Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Environmental Microbiology and Recycling of Agro-waste in Cold Region, College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163000, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory of Low-carbon Green Agriculture in Northeastern China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Daqing 163000, Heilongjiang, China

3 Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China

**Abstract: [Background]** Phosphorus in soil generally exists in the form of insoluble phosphate, which limits the direct absorption and utilization by plants. Phosphate-solubilizing bacteria can convert the insoluble phosphate in the environment into phosphorus that can be absorbed and utilized by plants. **[Objective]** To isolate and identify a highly efficient phosphate-solubilizing bacterial strain, and explore its phosphate-solubilizing capacity, plant growth-promoting effect, and related genes, so as to provide elite strain resources and theoretical support for the research and development of phosphate-solubilizing bacterial fertilizer. **[Methods]** The strain with significant phosphate-solubilizing effects was isolated from soil and identified based on physiological and biochemical characteristics as well as molecular evidence. The phosphate-solubilizing capability of the strain was determined by the transparent circle method and the Mo-Sb colorimetric method. Single-factor experiments were carried out to study the effects of different carbon sources, nitrogen sources, and insoluble phosphates on the phosphate-solubilizing capability of the strain. Further, the whole genome of the strain was sequenced by the next-generation sequencing platform, and the genes related to phosphate solubilizing and siderophore synthesis and transport in the genome were mined. Finally, the plant growth-promoting effect of the strain was assessed by the hydroponic experiment. **[Results]** Strain PSB-K was identified as *Acinetobacter baumannii*, with a phosphate-solubilizing index of 2.58. Strain PSB-K exhibited the highest phosphate-solubilizing capability in the case of glucose as the carbon source, potassium nitrate as the nitrogen source, and tricalcium phosphate as the insoluble phosphate, under which the soluble phosphorus concentration in the fermentation liquid reached 560.35  $\mu\text{g/mL}$ . The whole genome of strain PSB-K was 3 983 883 bp in length, containing 3 849 coding genes, including various genes involved in organic acid synthesis, phosphate transport, and siderophore synthesis and transport. The results of the hydroponic

experiment showed that strain PSB-K applied at  $2.50 \times 10^7$ ,  $2.50 \times 10^7$ , and  $1.25 \times 10^7$  CFU/mL demonstrated the strongest promoting effects on the leaf area, fresh weight, and root length of oilseed rape seedlings, which were increased by 72.15%, 72.08%, and 197.81%, respectively, compared with the control. **[Conclusion]** Strain PSB-K possessed the capability to solubilize a variety of insoluble phosphates, and carbon and nitrogen sources directly influenced the phosphate-solubilizing performance of the strain. With a growth-promoting effect on oilseed rape plants, this strain serves as a candidate for the development of microbial fertilizer. In addition, the whole-genome data provides a reference for understanding the phosphate-solubilizing mechanisms and mining functional genes of phosphate-solubilizing bacteria.

**Keywords:** phosphate-solubilizing bacteria; plant growth-promoting; *Acinetobacter*; whole genome sequencing

磷元素是植物生长过程中所需的重要元素，同时也是植物的生长限制因子之一，其含量仅次于氮和钾<sup>[1]</sup>，在植物生长过程中发挥至关重要的作用，参与了植物体内的光合作用、呼吸作用、能量的储存和传递，以及细胞分裂、细胞增大等过程，并且通过磷酸化和去磷酸化作用参与酶的活性调控<sup>[2-3]</sup>。因此，土壤中磷的生物有效性对植物的生长起关键性作用，在多种磷形态中，水溶态磷能够直接被植物吸收利用。但据相关研究报道，水溶态磷在土壤中含量极低，并且由于磷元素在土壤中极易被金属阳离子固定为难溶性磷酸盐，导致许多植株在生长过程中无法直接利用，我国约 75% 的土地存在缺磷问题<sup>[4]</sup>，严重影响了农业绿色发展。为了补充土壤中的水溶态磷，提高作物产量，实际生产过程中常向土壤中大量施用磷肥。研究表明，磷肥中的可溶性磷在施用后也会被作物转化为难吸收的难溶性磷酸盐，利用率仅为 15% 左右<sup>[5-6]</sup>，其余未被利用的磷肥被固定于土壤中易引起土壤板结、水体富营养化等环境问题<sup>[7]</sup>。因此，施用微生物菌剂以改善土壤中有效磷含量和提高作物的方法，被证明是一种绿色、经济、环保的农业生产手段<sup>[8]</sup>。

解磷微生物能够将土壤中难溶性磷酸盐

转化为可供植物吸收利用的磷，其种类繁多，目前研究及报道较多的解磷细菌主要包括欧文氏菌属(*Erwinia*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等；解磷真菌包括青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、根霉属(*Rhizopus*)等；放线菌主要有链霉菌属(*Streptomyces*)<sup>[9-10]</sup>。Li 等<sup>[11]</sup>通过对原核生物的菌株基因型进行系统遗传分析探究解磷微生物时，指出不动杆菌属(*Acinetobacter*)被认为是未来最有潜力的 6 种解磷菌之一。国内学者李文<sup>[12]</sup>、朱金峰等<sup>[13]</sup>也已分别从土壤中分离出 2 株解磷能力为 61.05  $\mu\text{g/mL}$  和 221.7  $\mu\text{g/mL}$  的不动杆菌属解磷细菌。目前，对于不动杆菌属解磷细菌的研究主要围绕解磷细菌的筛选、解磷能力的测定及优化，而对于其解磷分子机理和植物促生作用尚未深入探究<sup>[14-15]</sup>。

本研究旨在探究土壤中分离得到的高效解磷细菌 PSB-K 的解磷能力、解磷特性及促生作用，以期了解磷细菌和微生物菌肥提供菌种资源。同时利用二代测序平台 Illumina PE150 进行全基因组测序，分析预测可能与菌株 PSB-K 解磷能力和促生能力相关的基因，为解磷菌解磷机理研究提供数据支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

解磷菌 PSB-K 来自黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院黑龙江省寒区环境微生物与农业废弃物资源化利用重点实验室;甘蓝型油菜籽品种为中双 11 号。

### 1.2 培养基

LB 培养基参考文献[16]配制。无机磷(pikovskaya, PVK)液体/固体培养基参考文献[17]配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司;DL2000 DNA Marker, TaKaRa 公司。PCR 仪, Applied Biosystems 公司;人工气候箱,宁波江南仪器厂;恒温培养箱,上海博迅实业有限公司;可见光分光光度计,上海翱艺仪器有限公司;离心机, Thermo Fisher Scientific 公司; pH 计, Sartorius 公司; Covaris 超声波破碎仪, Diagenode 公司。

### 1.4 菌种的鉴定

#### 1.4.1 形态学特征

挑取 LB 培养基中 35 °C 纯化培养 2 d 的 PSB-K 单菌落,观察单菌落大小、形态、颜色等特征。

#### 1.4.2 分子生物学鉴定

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 PSB-K 的 DNA,采用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3)和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')进行扩增。PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 2 $\times$ Taq Master Mix 12.5  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 35 次循环; 72 °C 10 min。产物使用 1.5%琼脂糖凝胶

电泳检测,并由生工生物工程(上海)股份有限公司进行核苷酸序列测定,将测序结果上传至 GenBank 获得分离菌株登录号为 PQ496528,所得序列在 GenBank 数据库中进行比对,利用 MEGA 7.0 软件邻近法构建系统发育树。

#### 1.4.3 生理生化鉴定

根据参考文献[18]对菌株 PSB-K 进行多项生理生化鉴定。

### 1.5 菌株生长曲线的测定

将菌株 PSB-K 按 1%的接种量接种于 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养,分别于 0、2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28 h 取样,测定波长 600 nm 处的吸光度值( $OD_{600}$ 值),每组设置 3 个重复,以培养时间为横坐标,以  $OD_{600}$  值为纵坐标,绘制生长曲线。

### 1.6 解磷能力的测定

#### 1.6.1 解磷指数的测定

参考文献[19]测定菌株解磷指数(solubilization index, SI)。

#### 1.6.2 培养基中可溶性磷含量的测定

发酵液中可溶性磷含量的测定方法和相关试剂配制方法参考文献[20]进行,并以相应的空白培养基上清液作为对照组。

#### 1.6.3 菌株解磷能力动态测定及与 pH、 $OD_{600}$ 相关性分析

将菌株 PSB-K 以 1%的接种量接种至 PVK 液体培养基中,37 °C、180 r/min 连续发酵 120 h,期间对发酵液中 pH、可溶性磷含量及  $OD_{600}$  进行动态测定。

#### 1.6.4 对 5 种难溶性磷酸盐溶解能力的测定

分别以磷酸三钙、磷酸铝、磷酸铁、羟基磷灰石和磷矿粉作为 PVK 液体培养基的唯一磷源,1%接种量接种菌株 PSB-K,28 °C、180 r/min 培养 36 h 后测定培养基中可溶性磷含量。

### 1.6.5 不同碳源下菌株解磷能力的测定

以 PVK 液体培养基为基础,分别以相同浓度(1%)的葡萄糖、乳糖、果糖、麦芽糖和蔗糖为碳源,菌体接种量 1%,以不接种的培养基为对照(CK),28 °C、180 r/min 培养 36 h 后测定培养基中可溶性磷含量及 pH。

### 1.6.6 不同氮源下菌株解磷能力的测定

以 PVK 液体培养基为基础,分别以相同浓度的(0.05%)硫酸铵、硝酸钾、氯化铵、尿素和草酸铵为氮源,菌体接种量 1%,以不接种的培养基为对照(CK),28 °C、180 r/min 培养 36 h 后测定培养基中可溶性磷含量及 pH。

## 1.7 全基因组测序及功能注释

使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株 PSB-K 的 DNA,浓度纯度检测合格后,使用 Covaris 超声波破碎仪随机打断,再经末端修复、加 A 尾、加测序接头、PCR 扩增、片段筛选和纯化步骤完成整个文库制备工作,通过 Illumina PE150 平台测序,委托北京诺禾致源公司完成。利用 Illumina NovaSeq 测序平台对细菌 PSB-K 进行全基因组测序拼接,完成后使用 GeneMarkS 等生物信息学工具分析预测编码基因组成情况。

使用 readfq v10 将原始数据中的低质量数据进行过滤后得到有效数据(clean data)。对过滤后得到的 clean data 使用 SOAPdenovo、SPAdes、ABYSS 组装软件进行组装,使用 Contig Integrator for Sequence Assembly 软件进行整合,采用 gapcloser 等软件进行优化和补洞。使用 KEGG 对基因组信息进行功能注释,筛选出细菌发挥解磷功能及植物促生的相关基因。

## 1.8 毒力因子预测与微生物肥料质量安全评价

将菌株 PSB-K 基因组序列(登录号为 NMDC60146130)与毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)进行比对,参考欧洲食品

安全局(European Food Safety Authority, EFSA)中的相关指南,以同一性(identity)大于 80%、覆盖度(coverage)大于 70%和  $E$  值小于  $1 \times 10^{-10}$  为筛选标准,预测毒力因子<sup>[21]</sup>。

参考文献[22]对菌株 PSB-K 进行微生物肥料质量安全评价以验证其作为微生物肥料的可行性。

## 1.9 水培试验

将菌株 PSB-K 接种至 LB 液体培养基中,28 °C、220 r/min 培养至菌液浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL,然后 5 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,获得的菌体沉淀用 PVK 液体培养基重悬,菌液浓度分别调整为  $5.00 \times 10^7$ 、 $2.50 \times 10^7$ 、 $1.25 \times 10^7$ 、 $6.25 \times 10^6$  CFU/mL,这些菌液作为水培液(control bacteria, CB),并依次标记为 CB1、CB2、CB3 和 CB4。为抵消 PVK 培养基可能对植物生长产生的潜在影响,特设立无菌且对应稀释度的 PVK 培养基(control check, CK)作为对照组,分别记为 CK1、CK2、CK3 和 CK4,同时还设置无菌水(sterile water, SW)作为空白对照。

挑选大小均匀且饱满的油菜种子,4 °C 春化处理后于 50 °C 温水中浸泡 2 h,然后使用浓度为 3%的次氯酸钠溶液消毒 2 min,并用无菌水反复洗涤 5 次。用无菌镊子将处理后的油菜种子放入发芽盒中,覆盖以无菌水浸泡过的无菌纱布,放入 20 °C 恒温箱中。待种子萌发后,挑选出生长状况一致且健康的油菜芽移入水培盒中,置于人工气候培养箱中 20 °C 条件下培养 30 d,随后测定相关指标。在实验过程中,为确保无菌环境,发芽盒、水培盒和人工气候培养箱等实验器材均使用 75%乙醇擦拭消毒。

## 1.10 数据分析

采用 IBM SPSS Statistics 26.0 软件进行数据分析,针对各处理方式的试验组和对照组,分别执行差异显著性检验(采用 Duncan 法,显著性

水平设为  $P < 0.05$ ); 图形绘制则借助 Origin 2022 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌种鉴定及生长曲线测定结果

#### 2.1.1 形态学特征、分子生物学及生理生化鉴定结果

对解磷菌 PSB-K 进行菌落形态观察与革兰氏染色分析, 结果显示, 在 LB 培养基上培养 24 h 后, 该菌株的菌落呈淡黄色, 表面湿润, 呈圆形, 边缘整齐, 易挑取(图 1A)。革兰氏染色结果显示菌株 PSB-K 为革兰氏阴性菌, 菌体形态为杆状, 无芽孢(图 1B)。

经 PCR 扩增后菌株 PSB-K 的 16S rRNA 基因序列全长为 1 418 bp, 经序列比对和系统发育树分析(图 2), 显示该菌株与不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 相似性最高。菌株 PSB-K 的生理生化鉴定结果如表 1 所示, 根据生理生化与分子生物学结果, 综合判定菌株 PSB-K 为鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*)。

#### 2.1.2 菌株 PSB-K 的生长曲线

菌株 PSB-K 的生长曲线如图 3 所示, 其中,

在 0–2 h 期间, 菌株 PSB-K 处于调整期, 表现为生长速度较为缓慢; 自 2–12 h, 菌株进入对数生长期, 此阶段内菌株 PSB-K 呈现出快速增长的趋势; 从 20 h 开始, 菌株的生长速度缓慢, 并逐渐趋于稳定, 达到平台期。

### 2.2 菌株解磷能力的测定结果

#### 2.2.1 菌株解磷能力测定及数据分析

菌株 PSB-K 在无机磷固体培养基中生长情况见图 4A, 测定其 SI 值为 2.58。为了探究菌株 PSB-K 的解磷能力与  $OD_{600}$  和培养基 pH 之间的关系, 在对发酵液中可溶性磷含量、 $OD_{600}$  和 pH 的 120 h 动态测定实验中, 变化情况分别如图 4B–4D 所示。结果显示, pH 值在前 12 h 时快速下降至 4.33, 在第 24 h 时达到最低值 4.17, 随后平稳维持至 60 h 略有回升至数值为 4.81, 至 72 h 时 pH 值达到 5.57, 随后趋于平稳。培养基中可溶性磷含量在第 36 h 时达到最高, 达 404.67  $\mu\text{g/mL}$ 。以上结果显示, 菌株 PSB-K 在无机磷固体培养基和液体培养基中均显示出极强的解磷能力, 并且细菌在生长过程中大量溶解难溶性磷酸盐的同时降低了培养基的 pH 值, 表明产酸是菌株 PSB-K 解磷的主要手段。

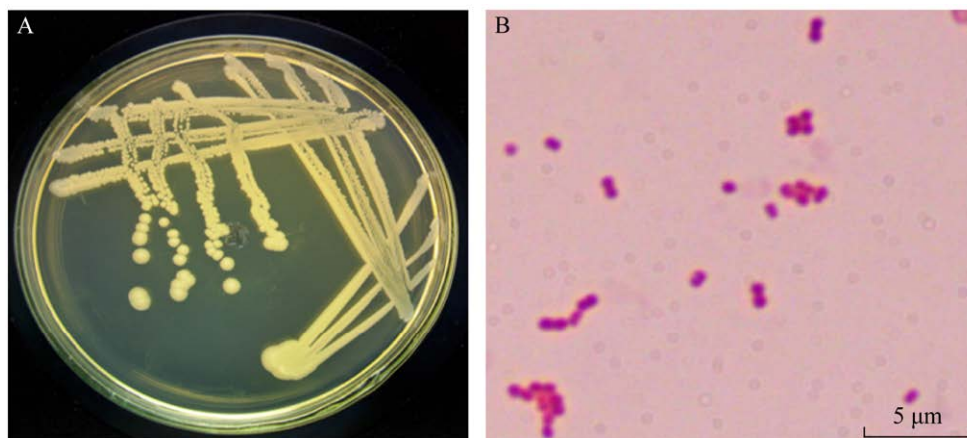


图 1 菌株 PSB-K 的菌落形态(A)和革兰氏染色结果(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and Gram staining results (B) of strain PSB-K.

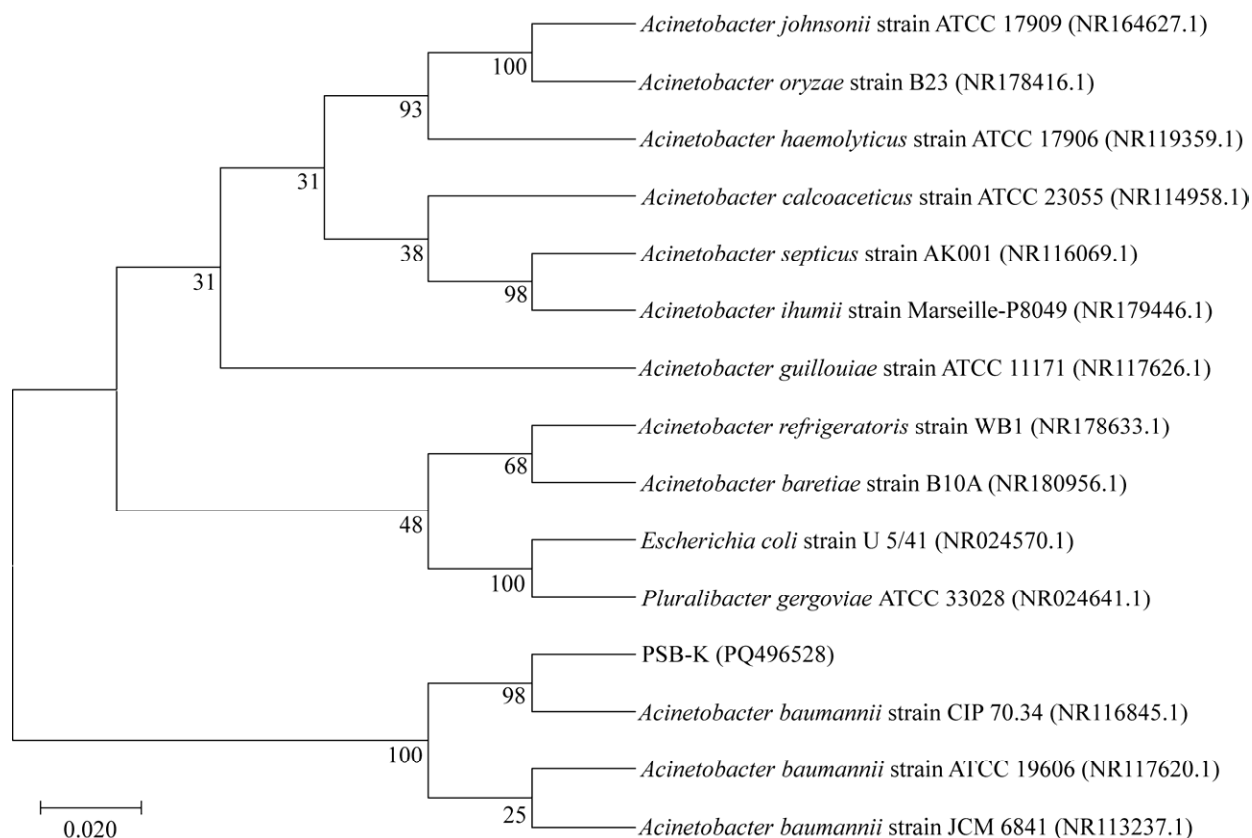


图2 基于16S rRNA基因序列构建的菌株PSB-K系统发育树 每一个分支点上的数字指的是bootstrap值, 用来评估该分支的可信度; 括号中的序号表示对应菌株的GenBank登录号; 分支的长度代表进化支变化的程度。

Figure 2 Phylogenetic tree of strain PSB-K based on 16S rRNA gene sequence. The numbers at each branch point refer to the bootstrap values, which are used to assess the credibility of the branch; The serial number in parentheses represents the GenBank login number of the corresponding strain; The length of the branches represents the degree of change in the evolutionary lineage.

表1 菌株PSB-K的生理生化鉴定结果

Table 1 Identification results of physiological and biochemical of strain PSB-K

Experiment name	Identification result
Glucose oxidative fermentation test	+
Methyl red test	+
Indole test	-
Voges-Prokauer test	-
Citrate test	+
Nitrate reduction test	-
Urease test	-

+: Positive; -: Negative.

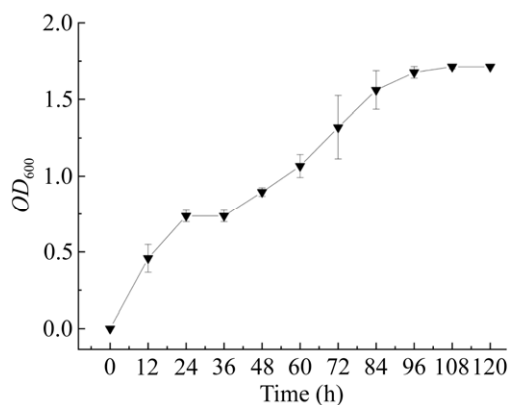
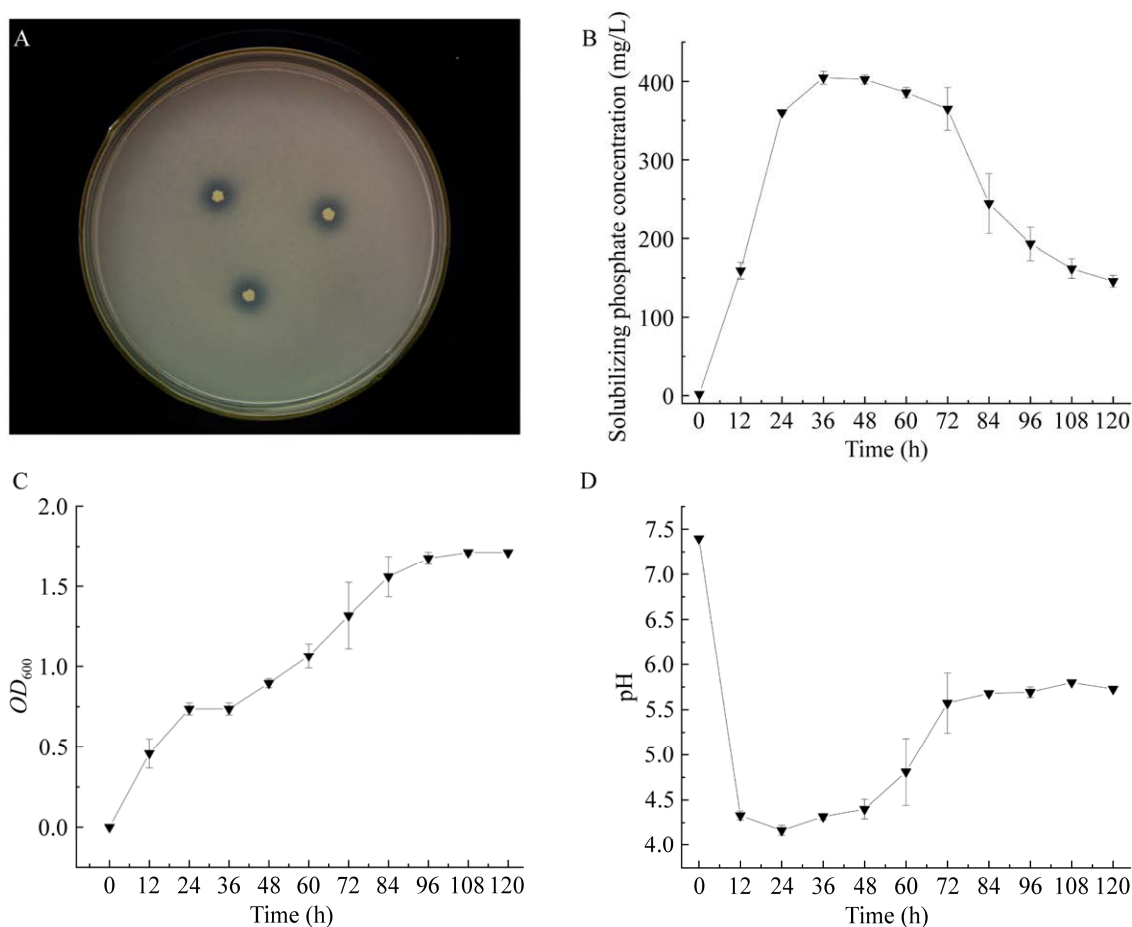


图3 菌株PSB-K的生长曲线

Figure 3 Growth curves of strain PSB-K.



**图 4** 菌株 PSB-K 解磷能力测定及在无机磷液体培养基的  $OD_{600}$  和 pH A: 菌株 PSB-K 在无机磷固体培养基中解磷能力测定; B: 发酵液可溶性磷含量变化; C: 发酵液中  $OD_{600}$  变化; D: 发酵液中 pH 变化。  
Figure 4 Determination of phosphate solubilization ability of strain PSB-K as well as  $OD_{600}$  and pH in inorganic phosphorus bacterial medium. A: The phosphate-solubilizing ability of strain PSB-K in an inorganic phosphorus solid culture medium; B: The change in soluble phosphorus content in the fermentation liquid; C: The change in  $OD_{600}$  in the fermentation liquid; D: The change in pH in the fermentation liquid.

使用 SPSS 分析发酵液中  $OD_{600}$ 、pH 和可溶性磷含量数据是否符合正态分布。结果显示,  $OD_{600}$  数据偏度系数为 0.287, 峰度系数为 1.414; pH 值数据偏度系数为 0.608, 峰度系数为 1.485; 可溶性磷含量数据偏度系数为 0.593, 峰度系数为 1.461。三组数据偏度系数和峰度系数均小于 1.960, 符合正态分布, 且满足皮尔逊相关系数分析条件。进一步使用皮尔逊相关系数对 3 组数据的相关性进行分析, 结果显示,

发酵液中可溶性磷含量与 pH 值和  $OD_{600}$  均呈极强负相关, 发酵液中 pH 值与  $OD_{600}$  呈极强正相关(表 2)。

### 2.2.2 菌株 PSB-K 对 5 种难溶性磷酸盐的溶解能力

土壤中的难溶性磷酸盐有不同存在形式, 因此研究进一步测定菌株 PSB-K 对 5 种难溶性磷酸盐的溶解能力。结果如图 5 所示, 菌株 PSB-K 对 5 种难溶性磷酸盐均有溶解能力,



表 2 皮尔逊相关系数分析

Table 2 Pearson correlation coefficient analysis

Index	pH	Solubilizing phosphate concentration	$OD_{600}$
pH	1	-0.823**	0.979**
Solubilizing phosphate concentration		1	-0.805**
$OD_{600}$			1

\*\* :  $P < 0.01$ .

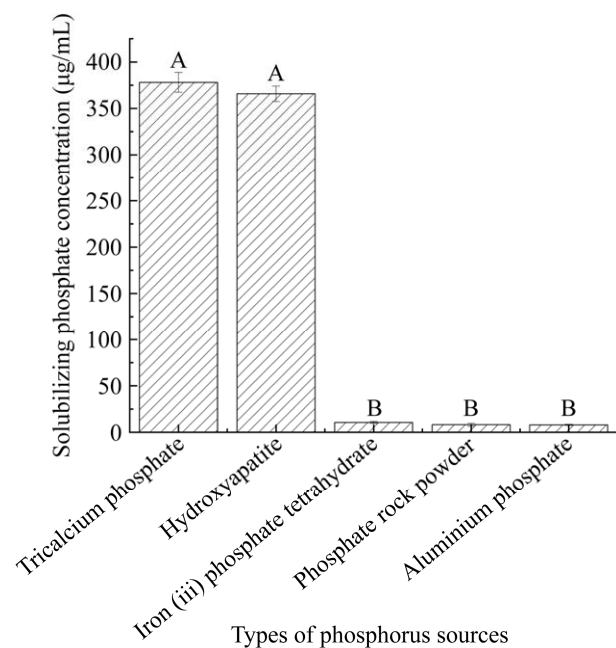


图 5 菌株 PSB-K 对 5 种难溶性磷酸盐的溶解能力 不同大写字母表示差异显著性 ( $P < 0.05$ )。

Figure 5 The capability of strain PSB-K to dissolve five kinds of insoluble phosphates. Different capital letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

但差距较大, 对不同难溶性磷酸盐的溶解能力依次为: 磷酸三钙( $377.96 \mu\text{g/mL}$ )>羟基磷灰石( $365.69 \mu\text{g/mL}$ )>磷酸铁( $10.50 \mu\text{g/mL}$ )>磷矿粉( $8.01 \mu\text{g/mL}$ )>磷酸铝( $7.87 \mu\text{g/mL}$ )。

### 2.2.3 不同碳源、氮源对菌株解磷能力的影响

培养基中的不同碳源可能会对菌株解磷能力产生影响, 因此本研究分析了不同碳源培养条件下菌株的可溶性磷含量。结果显示(图 6A), 葡

萄糖作为培养基中唯一碳源时, 发酵液中可溶性磷含量达  $560.35 \mu\text{g/mL}$ ; 乳糖次之, 发酵液中可溶性磷含量为  $77.57 \mu\text{g/mL}$ ; 果糖、麦芽糖和蔗糖作为单一碳源时发酵液中可溶性磷含量很低。采用葡萄糖和乳糖作为碳源的发酵液 pH 分别为 4.29 和 5.63 (均小于 6.0), 采用果糖、麦芽糖、蔗糖作为碳源的发酵液 pH 分别为 7.88、7.90 和 8.01。以上结果表明, 菌株发挥解磷能力的最适碳源为葡萄糖, 此时发酵液中 pH 值最低, 可溶性磷含量最高。

不同氮源对解磷能力影响如图 6B 所示。不同单一氮源下培养基中可溶性磷含量分别为: 硝酸钾( $526.54 \mu\text{g/mL}$ )>硫酸铵( $518.90 \mu\text{g/mL}$ )>草酸铵( $497.39 \mu\text{g/mL}$ )>氯化铵( $492.41 \mu\text{g/mL}$ )>尿素( $452.20 \mu\text{g/mL}$ )。发酵液中 pH 值分别为 4.25、4.27、4.21、4.29 和 4.23。数据分析结果显示, 除尿素以外其他 4 组氮源之间差异显著性  $P < 0.05$ , 表明氮源的种类对解磷菌 PSB-K 发挥解磷功能的影响不大。

## 2.3 全基因组序列分析

### 2.3.1 基因组测序与组装

Illumina NovaSeq 测序结果和编码基因分析结果如表 3 所示。菌株 PSB-K 基因组数据已上传至国家基因组数据中心, 登录号为 NMDC60146130。

### 2.3.2 基因组注释结果

使用 KEGG 数据库对解磷细菌 PSB-K 基因组的注释结果显示(图 7), 有 2 030 条基因被注释, 共包含 218 条代谢通路。其中一级分类中代谢途径(metabolic pathway)注释到基因数量最多, 二级分类中涉及基因数量较多的代谢通路主要有包括: 氨基酸代谢(amino acid metabolism)通路共 262 个基因、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)通路共 172 个基因、辅助因子和维生素代谢(metabolism of cofactors and vitamins)通路共 152 个基因。

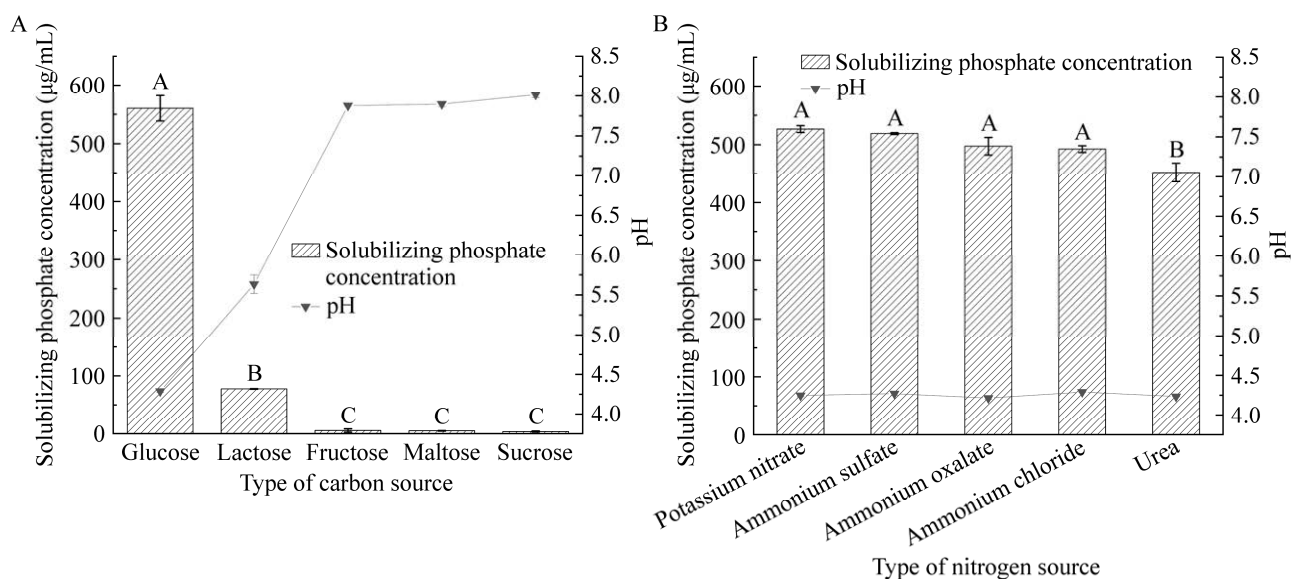


图 6 不同碳源(A)和氮源(B)培养基中可溶性磷含量和 pH 不同大写字母表示差异显著性( $P<0.05$ )。

Figure 6 Solubilizing phosphate concentration and pH in different carbon (A) and nitrogen sources (B) culture medium. Different capital letters indicate significant difference ( $P<0.05$ ).

表 3 基因组及编码基因分析结果

Table 3 Results of genome and composition coding genes analysis

Item	Result
Genome size (bp)	3 983 883
Scaffold number	56
Max length (bp)	427 547
Min length (bp)	1 326
Sequence G+C (%)	38.92
Gene number	3 849
Gene total length (bp)	3 458 379
Gene average length (bp)	899
Gene length/Genome (%)	86.81

筛选出的与解磷功能相关的基因如表 4 所示, 这些基因可分为有机酸产生、磷酸盐转运与磷缺乏响应 3 个类别。其中, 在有机酸产生方面, 菌株 PSB-K 携带了编码葡萄糖脱氢酶 (glucose dehydrogenase, GDH) 的关键基因 *gcd* 和 *gdh*, 以及完整的 GDH 辅酶因子——吡咯喹啉酮 (pyrroloquinoline quinone, PQQ) 合成基因簇 *pqqA-E*, 这为有机酸的生物合成奠定了坚实

基础。同时解磷菌 PSB-K 基因组还编码了完整的磷酸戊糖途径 (图 8A), 其中葡萄糖代谢的关键环节如图 8B 所示: 葡萄糖分子首先通过 *oprB* 基因 (K03762) 编码的葡萄糖/碳水化合物外膜孔蛋白穿过外膜进入周质空间; 然后, 在喹蛋白葡萄糖脱氢酶 (*gcd*, K00117) 的催化作用下, 葡萄糖被氧化为葡萄糖酸。随后, 一部分葡萄糖酸在 2-酮葡萄糖酸还原酶 (*ghrB*, K00090) 的作用下转化为 2-酮葡萄糖酸; 另一部分葡萄糖则通过葡萄糖酸通透酶 (*gntP*, K00851) 介导的跨膜转运进入细胞内, 并在葡萄糖酸激酶 (*gntK*, K03299) 的催化作用下转化为葡萄糖-6-磷酸, 参与后续的糖酵解或磷酸戊糖途径。其中, 产物葡萄糖酸和 2-酮葡萄糖酸是解磷菌发挥解磷能力的关键, 它们导致细胞周围区域酸化, 从而通过配体交换反应及与金属阳离子 (如  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$ ) 形成螯合物, 促进各种难溶性磷酸盐释放可溶性磷。此外, 菌株 PSB-K 的基因组还蕴含了多种其他有机酸合成途径的关键基因, 涉

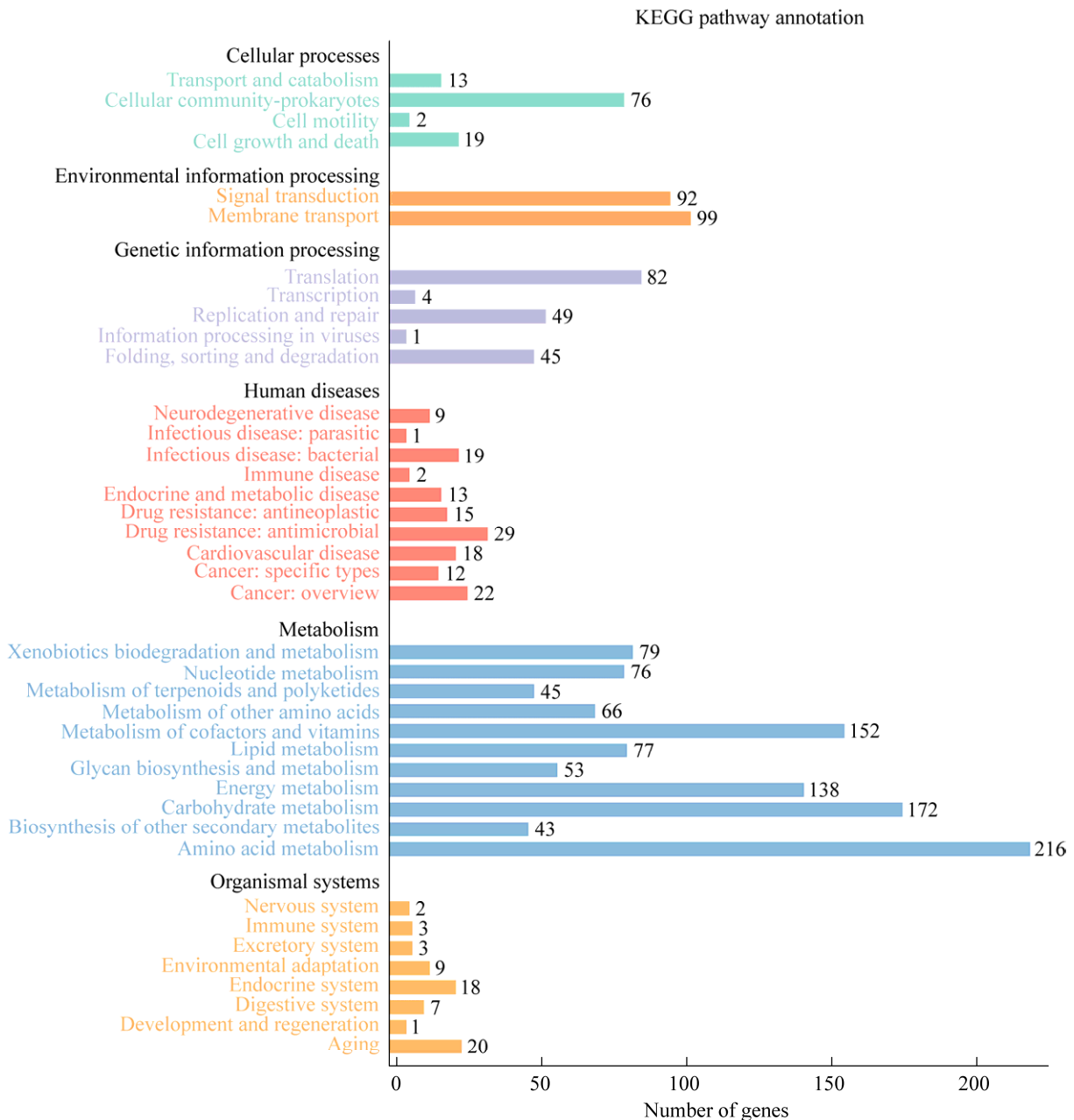


图 7 菌株 PSB-K 基因组 KEGG 数据库主要代谢通路分析

Figure 7 Analysis of major metabolic pathways in the strain PSB-K genome KEGG database.

及柠檬酸(由 *glaT* 基因调控)、延胡索酸(由 *fumABC* 基因簇编码)、乌头酸(*acnAB* 基因参与)和苹果酸(*aceB* 基因催化)等重要有机酸的合成。这些有机酸在调节环境 pH 值及促进难溶性磷酸盐溶解方面发挥着关键作用。

在磷酸盐转运机制方面,菌株 PSB-K 基因组包含了与磷酸盐转运系统相关的基因,包括:磷酸盐特殊转运系统(*pstBACS*)编码基因、磷酸盐转运系统(*pit*)编码基因,以及参与磷酸酯水解为磷酸盐和烷烃的 *phn* 基因簇中的 *phnAWX*

表 4 有机酸合成、磷酸盐转运及铁载体合成运输相关基因

Table 4 Genes related to organic acid synthesis, phosphate transport, and siderophore synthesis and transport

Function	Gene name	Product name	Gene code
Genes related to organic acid synthesis	<i>fumAB</i>	Fumarate hydratase	PSB.K_GM001169
	<i>fumC</i>	Fumarate hydratase	PSB.K_GM001546
	<i>acnA</i>	Aconitate hydratase	PSB.K_GM001116
	<i>acnB</i>	Aconitate hydratase	PSB.K_GM002129
	<i>aceB</i>	Malate synthase	PSB.K_GM000964
	<i>gdh</i>	UDPglucose 6-dehydrogenase	PSB.K_GM002033
	<i>pqqA</i>	Pyrrroquinoline quinone biosynthesis protein A	PSB.K_GM003129
	<i>pqqB</i>	Pyrrroquinoline quinone biosynthesis protein B	PSB.K_GM003130
	<i>pqqC</i>	Pyrrroquinoline-quinone synthase	PSB.K_GM003131
	<i>pqqD</i>	Pyrrroquinoline quinone biosynthesis protein D	PSB.K_GM003132
	<i>pqqE</i>	PqqA peptide cyclase	PSB.K_GM003133
	<i>gcd</i>	Quinoprotein glucose dehydrogenase	PSB.K_GM001505
	<i>gltA</i>	Citrate synthase	PSB.K_GM003088
	<i>aroK</i>	Shikimate kinase	PSB.K_GM000677
	Phosphate transport system-related genes	<i>pstB</i>	Phosphate transport system ATP-binding protein
<i>pstA</i>		Phosphate transport system permease protein	PSB.K_GM000227
<i>pstC</i>		Phosphate transport system permease protein	PSB.K_GM000228
<i>pstS</i>		Phosphate transport system substrate-binding protein	PSB.K_GM000229
<i>phnA</i>		Protein PhnA	PSB.K_GM001825
<i>pit</i>		Inorganic phosphate transport	PSB.K_GM001694
<i>phnA</i>		Phosphonoacetate hydrolase	PSB.K_GM001825
<i>phnW</i>		2-aminoethylphosphonate-pyruvate transaminase	PSB.K_GM002730
<i>phnX</i>		Phosphonoacetaldehyde hydrolase	PSB.K_GM002731
Phosphorus deficiency responds to regulatory genes		<i>phoR</i>	Phosphate regulon sensor histidine kinase PhoR
	<i>phoB</i>	Phosphate regulon response regulator PhoB	PSB.K_GM000491
Genes related to siderophore synthesis and transport	<i>entA</i>	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	PSB.K_GM003124
	<i>entB</i>	Enterobactin synthase subunit B	PSB.K_GM003125
	<i>entC</i>	Isochorismate synthase	PSB.K_GM000168
	<i>entD</i>	Enterobactin synthetase component D	PSB.K_GM000169
	<i>entE</i>	2,3-dihydroxybenzoate—[aryl-carrier protein] ligase	PSB.K_GM000176
	<i>fur</i>	Ferric uptake regulator	PSB.K_GM001606
	<i>putA</i>	RHH-type transcriptional regulator	PSB.K_GM000911
	<i>bfr</i>	Bacterioferritin	PSB.K_GM000689

基因。这些系统协同工作提高了磷元素的摄取与利用。在磷缺乏响应调控方面，菌株 PSB-K 通过由 *phoR/B* 双组分系统介导的复杂调控网络精准感知并响应低磷信号，调整基因表达模

式以适应不利条件，从而提升菌株在磷限制条件下的生存能力和对磷资源的利用。此外，菌株 PSB-K 基因组注释还揭示了其具备完整的铁载体合成与分泌系统，该系统由 *entA-E*、*fur*、

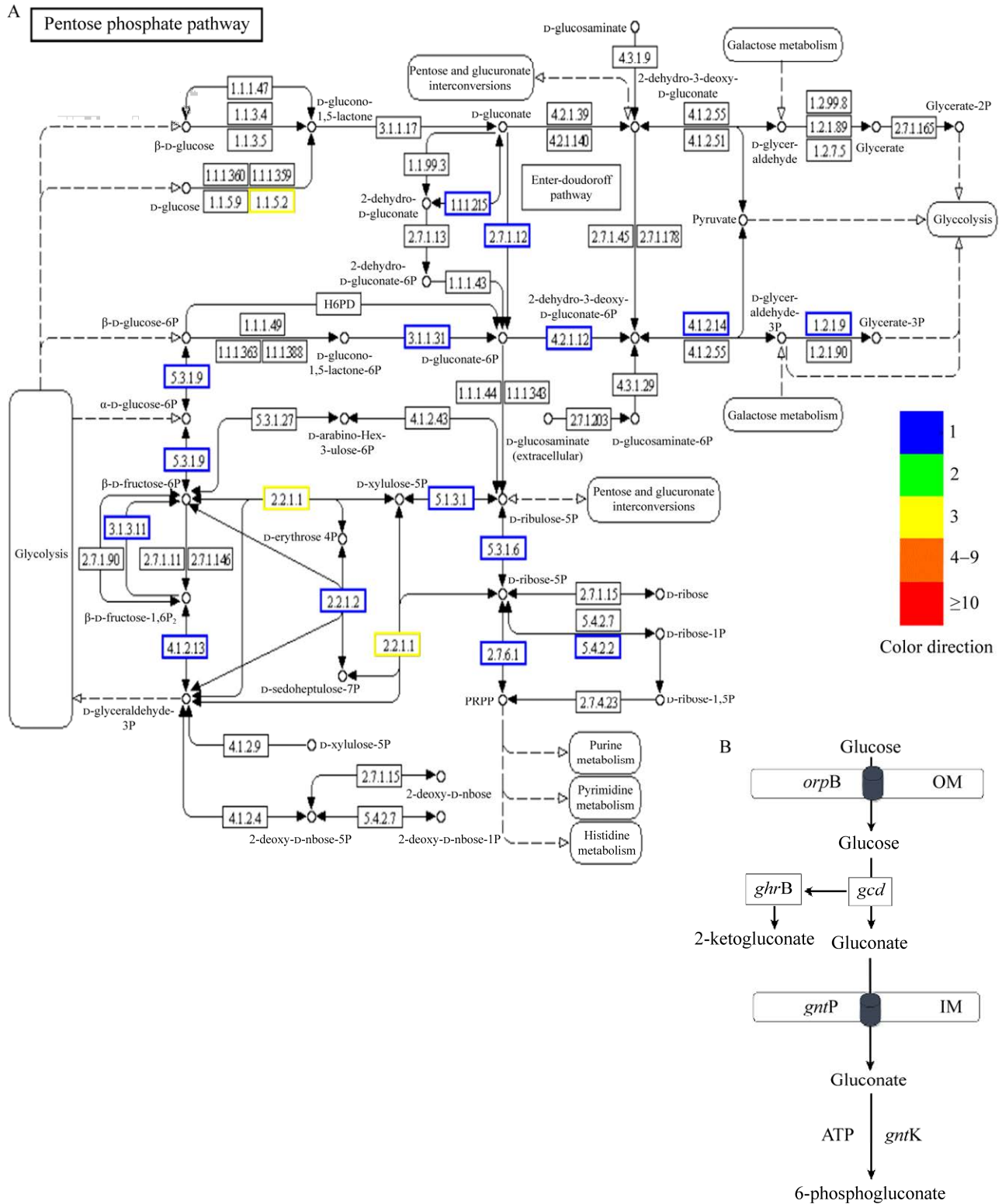


图 8 PSB-K 的磷酸戊糖途径以及葡萄糖酸和 2-酮葡萄糖酸的生成途径 A:PSB-K 的磷酸戊糖途径; B: 葡萄糖酸和 2-酮葡萄糖酸生成途径。oprB: 葡萄糖/碳水化合物外膜孔蛋白基因; gcd: 嗜蛋白葡萄糖

糖脱氢酶基因; *ghrB*: 2-酮葡萄糖酸还原酶基因; *gntP*: 葡萄糖酸通透酶基因; *gntK*: 葡萄糖酸激酶基因; OM: 外膜; PS: 周质空间; IM: 内膜。

Figure 8 The pentose phosphate pathway of PSB-K and the pathways for gluconic acid and 2-ketogluconate production. A: The pentose phosphate pathway of PSB-K; B: The pathways for the production of gluconic acid and 2-ketogluconate. *oprB*: Glucose/carbohydrate outer membrane porin gene; *gcd*: Quinoprotein glucose dehydrogenase gene; *ghrB*: 2-ketogluconate reductase gene; *gntP*: Gluconate permease gene; *gntK*: Gluconate kinase gene; OM: Outer membrane; PS: Periplasmic space; IM: Inner membrane.

*putA*、*bfr* 等基因协同作用, 支持铁载体的合成与分泌。铁载体的存在不仅增强了菌株对铁元素的捕获能力, 还可能通过影响铁与磷的相互作用, 间接提升菌株在磷资源有限环境中的竞争力。

#### 2.4 解磷菌 PSB-K 毒力因子预测和微生物肥料质量安全评价结果

通过毒力因子数据库(VFDB)比对分析, 菌株 PSB-K 编码 258 个潜在的毒力因子基因。然而, 这些基因与 VFDB 数据库中已收录基因的序列相似性普遍低于 60%。根据 KEGG 功能数据库的注释, 这些潜在的毒力基因主要被标注为参与次生代谢物的生物合成和代谢、生物膜形成及辅因子的生物合成。同时针对目前已有研究表明的鲍曼不动杆菌中多种参与调控应激反应、耐药性和毒力的调节因子如反应调节因子(*pmrA*)<sup>[23]</sup>、组氨酸激酶(*pmrB*)<sup>[23]</sup>、AdeRS 双组份系统(*adeRS*)<sup>[24]</sup>、BaeSR 双组分调节系统(*baeSR*)<sup>[25]</sup>、外膜蛋白 33-36 (*Omp33-36*)<sup>[26]</sup>、糖基转移酶(*lpsC*)<sup>[27]</sup>、蛋白质酪氨酸激酶(*ptk*)<sup>[28]</sup>以及最新发现的 2 个毒力决定簇 *gigA/gigB*<sup>[29]</sup> 等特有毒力基因, 在菌株 PSB-K 中均未检测到。

此外, 基因的表达形式和功能注释结果并不必然完全契合于传统毒力基因的定义范畴。因此, 为全面评估菌株 PSB-K 的安全性, 本研究依照 GB/T 41728—2022 微生物肥料质量安全评价通用准则<sup>[22]</sup>进一步对菌株 PSB-K 进行安全性评价, 结果如表 5 所示。评估结果表明,

菌株 PSB-K 满足作为微生物肥料生产用菌种的安全标准, 可作为微生物肥料生产用菌种。

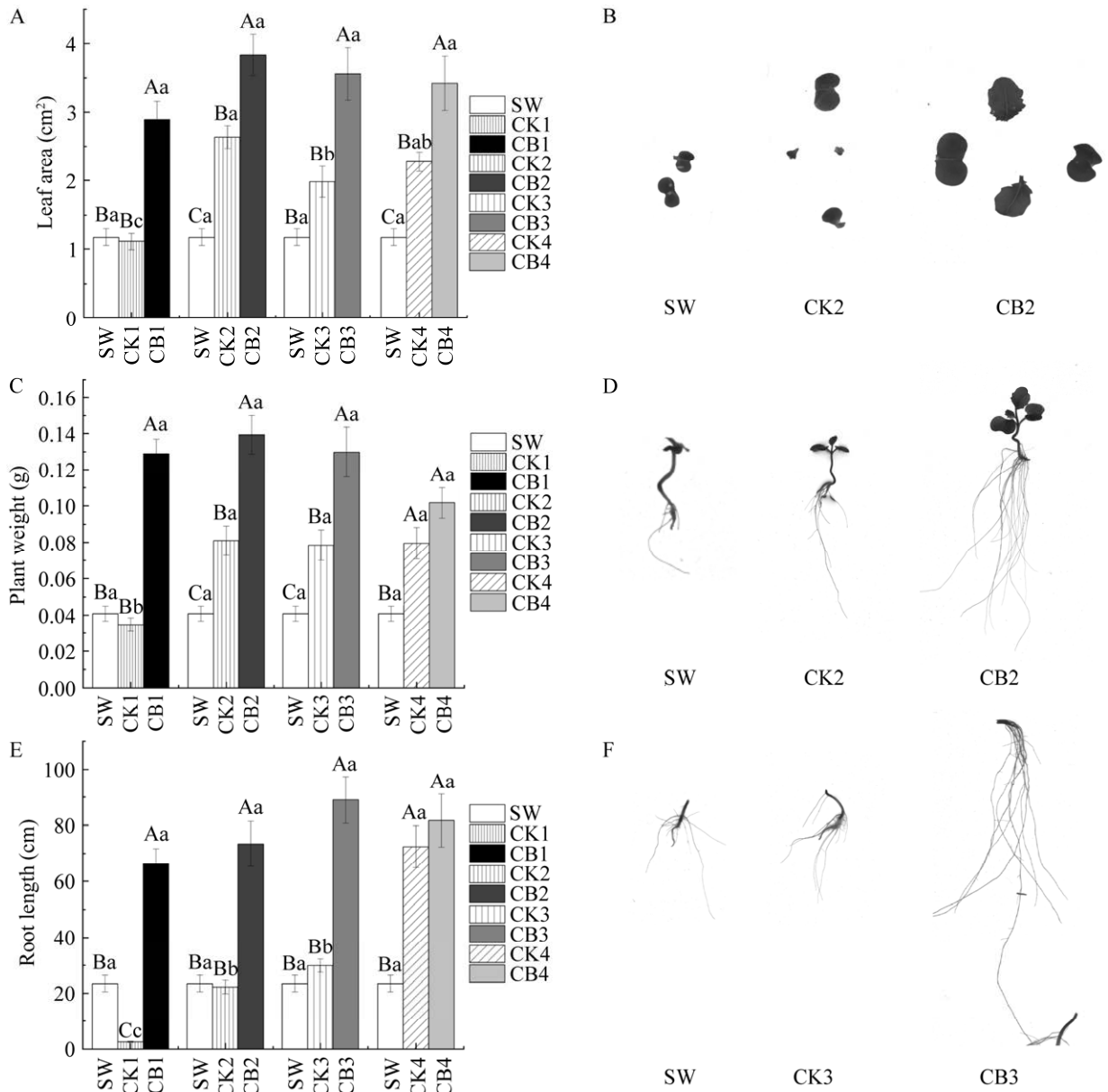
#### 2.5 油菜水培试验结果

上述研究表明, 菌株 PSB-K 不仅具有较强的解磷能力, 还具备完整的铁载体合成通路, 可以推测菌株 PSB-K 能将难溶性的磷酸盐有效转化为植物可吸收利用的可溶态磷形态, 从而促进植物生长。为验证这一假设, 本研究通过油菜水培试验探究菌株 PSB-K 对植物生长的具体影响。结果显示, 相较于对照组, 添加 PSB-K 菌液的实验组均显著促进了油菜幼苗的叶片面积增长( $P < 0.05$ ), 特别是在水培液中菌浓度为  $2.50 \times 10^7$  CFU/mL 时, 平均叶片面积达到最大值  $3.84 \text{ cm}^2$ , 但不同菌液浓度之间无显著性差异(图 9A、9B)。在植株鲜重方面, 当菌液浓度大于  $6.25 \times 10^6$  CFU/mL 时, 油菜幼苗的鲜重显著增加( $P < 0.05$ ), 当菌液浓度为  $2.50 \times 10^7$  CFU/mL 时, 鲜重最重, 达到  $0.14 \text{ g}$ ; 然而, 在  $6.25 \times 10^6$  CFU/mL 浓度下, 处理组与对照组差异未达显著水平(图 9C、9D)。在根系长度方面, 菌液浓度大于

表 5 菌株 PSB-K 安全性评价结果

Table 5 Safety evaluation results of strain PSB-K

Experiment name	Result
Acute oral toxicity test	Safe
A broken skin irritation test	Safe
Hemolysis test	Safe
Acute intraperitoneal injection pathogenicity test	Safe
Antimicrobial susceptibility test	Safe
Acute eye irritation test	Safe



**图 9 不同菌液浓度对油菜幼苗促生效果** A、C、E 分别为油菜叶片面积、植株鲜重和根系总长度测量值；B、D、F 分别为促生效果最佳的菌液浓度下 3 组不同处理的叶片、植株和根系的扫描图。不同大写字母表示同一菌液浓度下各组处理之间的差异达到 0.05 的显著水平；不同小写字母表示相同处理下不同菌液浓度之间的差异达到 0.05 的显著水平。

Figure 9 Growth promotion effect on oilseed rape seedlings under different bacterial concentrations. A, C and E are the measured values of leaf area, plant fresh weight and total root length of oilseed rape, respectively. B, D and F are the scanned images of leaves, plants and roots of three different treatments at the concentration of the bacterial solution with the best growth-promoting effect, respectively. Different capital letters indicate that the difference between the treatments with the same bacterial concentration reaches a significant level of 0.05. Different lowercase letters indicate that the difference between different bacterial concentrations under the same treatment reaches a significant level of 0.05.

$6.25 \times 10^6$  CFU/mL 的处理均显著促进了油菜幼苗的根系生长 ( $P < 0.05$ ), 其中, 菌液浓度为  $1.25 \times 10^7$  CFU/mL 时根系总长度最长(图 9E、9F); 但在  $6.25 \times 10^6$  CFU/mL 浓度下, 根系长度与对照组相比无显著性差异。总体而言, 随着菌液浓度降低, 不同处理下油菜幼苗叶片面积、植株鲜重和根系总长度的发展均呈现先上升后下降趋势。在这 3 项生理生化指标中, 各自促生效果最佳的菌液浓度分别为:  $2.50 \times 10^7$  CFU/mL (叶片面积)、 $2.50 \times 10^7$  CFU/mL (植株鲜重)、 $1.25 \times 10^7$  CFU/mL (根系长度), 相较于 CK 分别提高了 72.15%、72.08% 和 197.81%。

### 3 讨论

#### 3.1 培养基组分对菌株 PSB-K 解磷能力的影响

培养基中的碳、氮源种类均会影响解磷微生物的生长代谢, 进而影响其对难溶性磷酸盐的溶解效果, 并且不同解磷细菌对于不同种类的难溶性磷酸盐溶解能力也不同<sup>[3]</sup>。本研究发现, 鲍曼不动杆菌 PSB-K 发挥解磷功能最适的碳源是葡萄糖。原因可能是葡萄糖作为细菌生长与代谢过程中最通用的碳源之一, 能够直接被细胞利用, 从而促进了菌株 PSB-K 解磷功能的发挥。当葡萄糖作为唯一碳源时, 发酵液中可溶性磷含量达  $560.35 \mu\text{g/mL}$ , 解磷能力优于目前已分离出的大部分解磷微生物。培养基中氮源种类的多样性对菌株 PSB-K 解磷功能的影响并不显著, 该菌株能够高效利用不同种类的氮源, 并均展现出良好的解磷性能, 这表明其对氮源具有较强适应性。在不同种类的难溶性磷酸盐中, 钙磷通常在高 pH 值下更稳定更难分解, 因此在碱性土壤中钙磷含量较高, 而在酸性土壤中, 磷元素倾向于与  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  等离子结合, 形成不溶性铁磷和铝磷复合物, 这些复

合物更为稳定且含量丰富<sup>[30]</sup>。本研究发现, 菌株 PSB-K 对磷酸三钙和羟基磷灰石两种钙磷的溶解效果显著优于磷酸铁和磷酸铝, 所以该菌株更适合被添加到碱性土壤中, 以有效促进土壤中难溶性钙磷的溶解与利用。

#### 3.2 动态解磷试验中 pH、 $OD_{600}$ 变化监测及相关性分析

在无机磷培养基中对菌株 PSB-K 进行 120 h 解磷能力评估, 并同步监测发酵液中  $OD_{600}$ 、pH 值的变化时, 观察到以下现象: 第 24 h 发酵液中 pH 值达到最低点, 此时可溶性磷含量达到峰值附近并保持至第 48 h, 同时发酵液中  $OD_{600}$  也短暂稳定, 48 h 后发酵液中  $OD_{600}$  和 pH 快速升高, 而可溶性磷含量则相应减少, 之后三者趋于平稳。这一过程中, 可溶性磷含量先升高后降低的现象与李文等<sup>[12]</sup>研究结果一致, 原因可能是: 发酵初期, 发酵液中存在大量可以被微生物直接利用的磷, 被微生物吸收并用于自身生长代谢; 同时由于发酵液中 pH 显著降低, 培养环境可能不利于微生物继续生长; 然而, 随着环境条件逐渐恢复到适宜水平, 微生物活动恢复稳定, 可溶性磷的消耗与产生也达到新的平衡。对三者数据之间进行相关性分析显示, 菌株 PSB-K 发酵液中 pH 分别与可溶性磷含量和  $OD_{600}$  呈极强负相关和极强正相关, 这一结果表明, 产酸是菌株 PSB-K 发挥解磷功能的主要机制, 其通过降低环境 pH 来促进难溶性磷酸盐的溶解, 进而为微生物生长提供所需的磷营养, 同时微生物的生长增殖也伴随着  $OD_{600}$  值的增加。

#### 3.3 解磷菌 PSB-K 全基因组数据分析

目前对解磷菌解磷机理的研究表明: 大部分革兰氏阴性菌通过代谢产生低分子量的有机酸, 从而促进难溶性磷的溶解, 其中以葡萄糖酸最为常见<sup>[31]</sup>。葡萄糖酸的生成需要由 GDH 催化葡萄糖氧化, 并由 PQQ 作为辅助因子完成<sup>[32]</sup>。



具有较强解磷能力的革兰氏阴性菌能够利用 GDH 将葡萄糖直接氧化成葡糖酸,而后者会进一步被氧化为酸性极强的葡糖酮酸,从而溶解难溶性无机磷<sup>[33-34]</sup>。Pérez 等<sup>[35]</sup>从委内瑞拉铁矿土壤中分离筛选出 10 株具有较好解磷能力的细菌,其中 5 株细菌含有 *gcd* 基因,并且其发酵液中均有葡糖酸。本研究对菌株 PSB-K 全基因组进行了深入分析,发现其具有编码 GDH 的关键基因 *gcd*、分泌葡糖酸和 2-酮葡糖酸的必需基因 *gdh* 及 *ghrB* 以及完整的 GDH 辅酶 PQQ 合成基因簇(*pqqA-E*)。此外,菌株 PSB-K 还包含其他多种有机酸合成途径的基因,如延胡索酸(*fumABC*)、柠檬酸(*gltA*)、乌头酸(*acnAB*)和苹果酸(*aceB*)的合成基因等。已有研究表明,解磷菌分泌有机酸的种类及其含量对其解磷能力具有显著影响<sup>[10]</sup>。据此分析,菌株 PSB-K 主要通过调节这些有机酸的合成与分泌,以产生葡糖酸和 2-酮葡糖酸及其他多种有机酸降低环境的 pH 值,从而有效地增强其解磷能力,为土壤中的植物提供更加丰富的磷素资源。

同时,菌株 PSB-K 基因组中还存在其他与解磷功能相关的基因,如:低亲和力但高速的磷酸盐转运系统(*pit*)、高亲和力磷酸盐转运系统(*pstBACS*)<sup>[15]</sup>和双组分调节系统 PhoR/B (*phoRB*)<sup>[36]</sup>等。这些基因均可能参与调节细菌对磷的吸收和利用,且双组分调节系统 PhoR/B 使得菌株 PSB-K 还具有适应低磷环境的潜力<sup>[36]</sup>。以上发现不仅揭示了菌株 PSB-K 在农业应用中的巨大潜力,也为未来通过基因工程手段优化菌株性能提供了重要的理论依据。

### 3.4 水培促生油菜试验

油菜作为我国重要的油料作物,缺磷时的症状十分明显,而我国土壤普遍面临磷素匮乏的问题,这常导致油菜减产和产油量降低<sup>[37]</sup>。王丹等<sup>[38]</sup>研究表明油菜根系的改良是提高油菜

获得生长所需营养要素的有效途径,而磷素在植株根系发育过程中起到了关键的作用<sup>[39]</sup>。王同等<sup>[40]</sup>通过接种解磷微生物显著促进了作物根系的生长,包括作物根长和根尖数的增加。磷缺乏会影响植物的生长发育,但磷过多也会阻碍植物对其他元素的吸收和利用。本研究通过水培试验发现,在水培液中添加不同量的 PSB-K 菌液,能将水培液中难溶性磷酸盐转化为植物可利用的可溶态磷,除最低菌液浓度处理组 CB4 外,油菜植株鲜重、根系总长度及叶片面积均有显著增加,说明添加一定浓度的菌株 PSB-K 可以促进油菜幼苗生长。同时,菌株 PSB-K 作为产铁载体细菌,还可以整合周围环境中的 Fe,不仅可以改善自身营养状况,还为植物提供了铁源,进一步促进了植物生长<sup>[41]</sup>。不动杆菌属细菌在自然界中存在广泛,是土壤微生物的重要组成部分<sup>[42]</sup>,其强大的生存与定殖能力为微生物菌肥的开发应用提供了广阔前景。

## 4 结论

对于本实验室保存的一株具有高效解磷能力的细菌 PSB-K,本研究经形态学、显微特征观察、生理生化分析以及 16S rRNA 基因测序,鉴定其为鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)。该菌株解磷指数(SI 值)为 2.58,在葡萄糖作为最适碳源、硝酸钾作为最适氮源时,解磷能力最强,此时发酵液中可溶性磷含量可达 560.35  $\mu\text{g/mL}$ ,尤以对磷酸三钙溶解性最好。

全基因组测序结果及基因组注释结果表明,PSB-K 基因组长度为 3 983 883 bp, G+C 含量为 38.92%,含有完整的磷酸戊糖代谢通路,葡糖酸及其他多种有机酸产生(*gdh*、*gcd*、*pqqA-E*、*glaT*、*fumABC*、*acnAB*、*aceB*、*aroK* 等基因)、磷酸盐转运(*pstBACS* 和 *pit* 基因)、磷缺乏调控(*phoRB* 基因)和磷酸酯降解(*phnAWX*

基因)及铁载体合成与转运(*entA-E*、*fur*、*putA*、*bfr* 基因)相关的基因序列。结合菌株 PSB-K 生长过程中降低发酵液中 pH 值以及最适碳源为葡萄糖的试验结果,推测通过产生多种有机酸,尤其葡萄糖酸,是其解磷作用的主要机制。

水培试验结果表明,菌株 PSB-K 能显著促进油菜幼苗的生长,除处理组 CB4 外,其他处理组均表现为油菜植株鲜重、根系总长度及叶片面积的显著增加。然而,不同菌液添加量对促生效果的影响存在差异,以及实验室环境与实际生产应用的土壤环境仍存在较大差异,因此其在实际农业生产中的应用效果仍需进一步探索。

本研究不仅为微生物菌肥的研发提供了优良的菌株资源,还基于全基因组测序数据,从分子层面深入分析了菌株 PSB-K 的解磷机制,为解磷菌的相关研究提供了重要的理论依据和支持。

## REFERENCES

- [1] REN CJ, ZHAO FZ, KANG D, YANG GH, HAN XH, TONG XG, FENG YZ, REN GX. Linkages of C:N:P stoichiometry and bacterial community in soil following afforestation of former farmland[J]. *Forest Ecology and Management*, 2016, 376: 59-66.
- [2] CHIOU TJ, LIN S. Signaling network in sensing phosphate availability in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2011, 62: 185-206.
- [3] 吕俊, 潘洪祥, 于存. 马尾松根际溶磷细菌 *Paraburkholderia* sp. 的筛选、鉴定及溶磷特性研究[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 147-156.  
LÜ J, PAN HX, YU C. Screening, identification and phosphate-solubilizing characteristics of phosphate-solubilizing *Paraburkholderia* sp. from *Pinus massoniana* rhizosphere soil[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 147-156 (in Chinese).
- [4] 覃书伟, 黄美卉, 杨光, 刘敏, 郭欢, 李亚航, 张霞, 曹爱萍. 不同水肥管理对红花生长的影响及红花根际解磷菌的筛选和鉴定[J]. *微生物学报*, 2024, 64(2): 548-564.  
QIN SW, HUANG MH, YANG G, LIU M, GUO H, LI YH, ZHANG X, CAO AP. Effects of different water and fertilizer management measures on the growth of safflower and screening and identification of phosphorus-solubilizing bacteria in safflower rhizosphere[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(2): 548-564 (in Chinese).
- [5] SINGH H, REDDY MS. Effect of inoculation with phosphate solubilizing fungus on growth and nutrient uptake of wheat and maize plants fertilized with rock phosphate in alkaline soils[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2011, 47(1): 30-34.
- [6] 闫湘, 金继运, 梁鸣早. 我国主要粮食作物化肥增产效应与肥料利用效率[J]. *土壤*, 2017, 49(6): 1067-1077.  
YAN X, JIN JY, LIANG MZ. Fertilizer use efficiencies and yield-increasing rates of grain crops in China[J]. *Soils*, 2017, 49(6): 1067-1077 (in Chinese).
- [7] 邹芳芳, 贾作平, 杨道能, 杨靖, 朱志刚, 常伟然. 磷污染的危害及防治[J]. *比较化学*, 2020, 4(4): 35-38.  
ZOU FF, JIA ZP, YANG DN, YANG J, ZHU ZG, CHANG WR. Hazard and Prevention of Phosphorus Pollution[J]. *Journal of Comparative Chemistry*, 2020, 4(4): 35-38 (in Chinese).
- [8] 李俊, 姜昕, 马鸣超. 新形势下微生物肥料产业运行状况及发展方向[J]. *植物营养与肥料学报*, 2020, 26(12): 2108-2114.  
LI J, JIANG X, MA MC. Situation and development direction for microbial fertilizer industry in the near future of China[J]. *Journal of Plant Nutrition and Fertilizers*, 2020, 26(12): 2108-2114 (in Chinese).
- [9] 刘峰, 张培雨, 姜雯, 刘树堂, 孙雪芳, 赵子铨, 刘湘, 孙青. 解磷真菌产紫青霉菌 SW-10 全基因组测序及功能分析[J]. *山东农业科学*, 2023, 55(9): 1-9.  
LIU F, ZHANG PY, JIANG W, LIU ST, SUN XF, ZHAO ZX, LIU X, SUN Q. Whole genome sequencing and function analysis of phosphate-solubilizing fungi *Penicillium purpurogenum* SW-10[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2023, 55(9): 1-9 (in Chinese).
- [10] 池景良, 郝敏, 王志学, 李杨. 解磷微生物研究及应用进展[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(1): 1-7.  
CHI JL, HAO M, WANG ZX, LI Y. Advances in research and application of phosphorus-solubilizing microorganism[J]. *Journal of Microbiology*, 2021, 41(1): 1-7 (in Chinese).
- [11] LI JT, LU JL, WANG HY, FANG Z, WANG XJ, FENG SW, WANG Z, YUAN T, ZHANG SC, OU SN, YANG XD, WU ZH, DU XD, TANG LY, LIAO B, SHU WS, JIA P, LIANG JL. A comprehensive synthesis unveils the mysteries of phosphate-solubilizing microbes[J]. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 2021, 96(6): 2771-2793.
- [12] 李文, 戴玲, 王陶, 严斌, 倪琳, 李同祥. 不动杆菌 JL-1 菌株的解磷机理[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(5): 1377-1387.  
LI W, DAI L, WANG T, YAN B, NI L, LI TX. Research on phosphate solubilization by *Acinetobacter indicus* JL-1[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(5): 1377-1387 (in Chinese).
- [13] 朱金峰, 孙会忠, 王小东, 李广良, 孙明辉, 陈冲, 陈启龙. 解磷菌 YYF-3 的分离鉴定及其生长特征[J]. *热带生物学报*, 2016, 7(2): 259-264.  
ZHU JF, SUN HZ, WANG XD, LI GL, SUN MH, CHEN C, CHEN QL. Isolation and identification of phosphate accumulating strain YYF-3 and its growth characteristics[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2016, 7(2): 259-264 (in Chinese).
- [14] 王帅, 吕鸿睿, 张昊, 吴占文, 肖翠红, 孙冬梅. 解磷菌 PSB-R 全基因组测序鉴定及其解磷特性分析[J].

- 生物技术通报, 2023, 39(1): 274-283.  
WANG S, (LÜ/LV/LU/LYU) HR, ZHANG H, WU ZW, XIAO CH, SUN DM. Whole-genome sequencing identification of phosphate-solubilizing bacteria PSB-R and analysis of its phosphate-solubilizing properties[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(1): 274-283 (in Chinese).
- [15] 郭小丹, 唐珊, 余水静. 脐橙根际解磷菌的分离鉴定及全基因组测序分析[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(10): 39-47.  
GUO XD, TANG S, YU SJ. Isolation, identification and genome sequencing analysis of phosphate-solubilizing bacteria in the rhizosphere of navel orange[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(10): 39-47 (in Chinese).
- [16] 韩月颖, 张喜庆, 曲云鹏, 高云航. 一株低温木质素降解菌的筛选、产酶优化及酶学性质[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(10): 3700-3713.  
HAN YY, ZHANG XQ, QU YP, GAO YH. Screening, enzyme-production optimization and enzymatic properties of a low-temperature lignin-degrading bacteria[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(10): 3700-3713 (in Chinese).
- [17] SULEMAN M, YASMIN S, RASUL M, YAHYA M, ATTA BM, MIRZA MS. Phosphate solubilizing bacteria with glucose dehydrogenase gene for phosphorus uptake and beneficial effects on wheat[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0204408.
- [18] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984.  
Buchanan RE, Gibbons NE. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese).
- [19] 高威, 左振宇, 李凌凌, 周圣玉, 聂静雨, 陈慧文. 一株高效解磷菌的筛选鉴定及溶磷性能[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(9): 3873-3889.  
GAO W, ZUO ZY, LI LL, ZHOU SY, NIE JY, CHEN HW. Isolation, identification, and characterization of a phosphate-solubilizing bacterial strain[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(9): 3873-3889 (in Chinese).
- [20] 中华人民共和国农业部. 植株全磷含量测定 钼锑抗比色法: NY/T 2421—2013[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.  
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Determination of total phosphorus in plant—Vanadium molybdate blue colorimetric method: NY/T 2421—2013[S]. Beijing: China Agriculture Press, 2014 (in Chinese).
- [21] European Food Safety Authority (EFSA). EFSA statement on the requirements for whole genome sequence analysis of microorganisms intentionally used in the food chain[J]. *EFSA Journal*, 2021, 19(7): e06506.
- [22] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 微生物肥料质量安全评价通用准则: GB/T 41728—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2023.  
State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. General criteria for quality and safety evaluation of microbial fertilizer: GB/T 41728—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2023 (in Chinese).
- [23] ARROYO LA, HERRERA CM, FERNANDEZ L, HANKINS JV, TRENT MS, HANCOCK REW. The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid a[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55(8): 3743-3751.
- [24] ROY S, JUNGHARE V, DUTTA S, HAZRA S, BASU S. Differential binding of carbapenems with the AdeABC efflux pump and modulation of the expression of AdeB linked to novel mutations within two-component system AdeRS in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*[J]. *mSystems*, 2022, 7(4): e0021722.
- [25] LIN MF, LIN YY, LAN CY. The role of the two-component system BaeSR in disposing chemicals through regulating transporter systems in *Acinetobacter baumannii*[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132843.
- [26] RUMBO C, TOMÁS M, MOREIRA EF, SOARES NC, CARVAJAL M, SANTILLANA E, BECEIRO A, ROMERO A, BOU G. The *Acinetobacter baumannii* Omp33-36 porin is a virulence factor that induces apoptosis and modulates autophagy in human cells[J]. *Infection and Immunity*, 2014, 82(11): 4666-4680.
- [27] WANG ND, OZER EA, MANDEL MJ, HAUSER AR. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung[J]. *mBio*, 2014, 5(3): e01163-14.
- [28] ILAN O, BLOCH Y, FRANKEL G, ULLRICH H, GEIDER K, ROSENSHINE I. Protein tyrosine kinases in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide[J]. *The EMBO Journal*, 1999, 18(12): 3241-3248.
- [29] ZHOU H, GEBHARDT MJ, CZYZ DM, YAO YK, SHUMAN HA. The *gigA/gigB* genes regulate the growth, stress response, and virulence of *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 strain[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 723949.
- [30] BASHAN Y, KAMNEV AA, DE-BASHAN LE. A proposal for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth[J]. *Biology and Fertility of Soils*, 2013, 49(1): 1-2.
- [31] GOLDSTEIN AH, BRAVERMAN K, OSORIO N. Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 1999, 30(4): 295-300.
- [32] 刘艳, 曹永清, 孟静, 晋婷婷, 任嘉红. 荧光假单胞菌 CLW17 菌株 *pqqE* 和 *GDH* 基因的功能[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(2): 529-544.  
LIU Y, CAO YQ, MENG J, JIN TT, REN JH. Functional analysis of *pqqE* and *GDH* genes in *Pseudomonas fluorescens* CLW17 strain[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(2): 529-544 (in Chinese).
- [33] LIU ST, LEE LY, TAI CY, HUNG CH, CHANG YS, WOLFRAM JH, ROGERS R, GOLDSTEIN AH. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for

- gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(18): 5814-5819.
- [34] SASHIDHAR B, PODILE AR. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 1-12.
- [35] PÉREZ E, SULBARÁN M, BALL MM, YARZÁBAL LA. Isolation and characterization of mineral phosphate-solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south-eastern Venezuelan region[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(11): 2905-2914.
- [36] 王正, 吴玲玉, 刘玉洁, 张雪洪, 黄显清. 假单胞菌 H78 中 PhoR/B 系统对磷元素吸收及其藤黄绿菌素合成的调控[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 1881-1886. WANG Z, WU LY, LIU YJ, ZHANG XH, HUANG XQ. Regulation of PhoR/B system on utilization of phosphorus and Pit biosynthesis in *Pseudomonas* sp. H78[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 1881-1886 (in Chinese).
- [37] 李爽, 徐珂, 李海源, 王召鑫, 王晨光, 徐平, 王效华. 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑甘蓝型油菜富甘氨酸蛋白基因 BnGRP1 的初步研究[J]. *中国油料作物学报*, 2023, 45(1): 38-45. LI S, XU K, LI HY, WANG ZX, WANG CG, XU P, WANG XH. Preliminary study of BnGRP1 gene editing by CRISPR/Cas9 in *Brassica napus* L.[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2023, 45(1): 38-45 (in Chinese).
- [38] 王丹, 赵学强, 郑春丽, 沈仁芳. 两种根际促生菌在不同氮磷条件下对油菜生长和养分吸收的影响[J]. *土壤*, 2017, 49(6): 1078-1083. WANG D, ZHAO XQ, ZHENG CL, SHEN RF. Effects of two RGPRs on growth and nutrient uptake of rape under different nitrogen and phosphorus conditions[J]. *Soils*, 2017, 49(6): 1078-1083 (in Chinese).
- [39] ELHAISOUI W, KHOURCHI S, IBNYASSER A, GHOULAM C, RCHIAD Z, ZEROUAL Y, LYAMLOULI K, BARGAZ A. Phosphate solubilizing rhizobacteria could have a stronger influence on wheat root traits and aboveground physiology than rhizosphere P solubilization[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 979.
- [40] 王同, 孔令雅, 焦加国, 刘满强, 胡锋, 孙波, 李辉信. 盆栽条件下溶磷菌对花生生长的影响[J]. *土壤*, 2014, 46(2): 313-318. WANG T, KONG LY, JIAO JG, LIU MQ, HU F, SUN B, LI HX. Effects of phosphate-solubilizing bacteria B1 (*Bacillus thuringiensis*) on peanuts in pot experiment[J]. *Soils*, 2014, 46(2): 313-318 (in Chinese).
- [41] 杨凯元, 韩玲娟, 梁银萍, 黄臣, 蒋霖, 赵祥, 高鹏. 达乌里胡枝子产铁载体根瘤内生细菌的鉴定及其促生抗逆效应[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(10): 4413-4432. YANG KY, HAN LJ, LIANG YP, HUANG C, JIANG L, ZHAO X, GAO P. Siderophore-producing endophytic bacteria in the root nodules of *Lespedeza daurica*: identification and examination of growth-promoting effect and stress resistance[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(10): 4413-4432 (in Chinese).
- [42] 刘玉华, 王慧, 胡晓珂. 不动杆菌属(*Acinetobacter*) 细菌降解石油烃的研究进展[J]. *微生物学通报*, 2016, 43(7): 1579-1589. LIU YH, WANG H, HU XK. Recent advances in the biodegradation of hydrocarbons by *Acinetobacter* species[J]. *Microbiology China*, 2016, 43(7): 1579-1589 (in Chinese).