

## 解磷细菌 PSB3 的筛选及拮抗作用的研究

余贤美<sup>1</sup> 王 义<sup>2</sup> 沈奇宾<sup>2</sup> 李炳龙<sup>2</sup> 贺春萍<sup>1</sup> 郑服从<sup>1,2\*</sup>

(1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所 儋州 571737)

(2. 海南大学 环境与植物保护学院 儋州 571737)

**摘 要:** 利用有机磷细菌液体培养基进行生物富集, 无机磷细菌固体培养基通过平板稀释法进行分离筛选, 建立了土壤解磷细菌的筛选体系。扩增菌株 PSB3 的 16S rDNA 序列, 序列测定结果显示, 该片段长度为 1525 bp, 经 Blastn 搜索进行序列比对, 该细菌为洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*)。对该菌株与供试的 12 个炭疽菌和镰刀菌菌株进行室内拮抗试验, 结果显示, 该菌株对 *Fusarium solani* 等 6 个菌株有不同程度的拮抗作用。

**关键词:** 解磷细菌, 生物富集, 筛选体系, 16S rDNA, 分子鉴定, 拮抗作用

## The Screening of Phosphorus Solubilizing Bacteria PSB3 and the Study of Its Antagonism

YU Xian-Mei<sup>1</sup> WANG Yi<sup>2</sup> SHEN Qi-Bin<sup>2</sup> LI Bing-Long<sup>2</sup>  
HE Chun-Ping<sup>1</sup> ZHENG Fu-Cong<sup>1,2\*</sup>

(1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou 571737)

(2. Environment and Plant Protection College, Hainan University, Danzhou 571737)

**Abstract:** The screening system of phosphorus solubilizing bacteria in the soil was established by biological enriching using organic phosphobacteria liquid medium and then screening via plate dilution method using inorganic phosphobacteria solid medium. By 16S rDNA sequencing technique, the strain PSB3 with the 16S rDNA gene of 1525 bp length was identified as *Burkholderia cepacia* by Blastn search in NCBI database. The results of in-door antagonism experiment of PSB3 to 12 strains of *Fusarium* and *Colletotrichum* (*Fusarium solani* et al) showed that PSB3 had antagonism reaction against 6 of the 12 pathogens.

**Keywords:** Phosphorus solubilizing bacteria, Biological enrichment, Screening system, 16S rDNA, Molecular identification, Antagonism

磷是植物生长必需的营养元素之一, 我国有 74% 的耕地土壤缺磷, 土壤中 95% 以上的磷为无效形式, 植物很难直接吸收利用<sup>[1]</sup>。施入的磷肥当季作物利用率为 5%~25%, 大部分磷与土壤中的  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  结合, 形成难溶性磷酸盐, 因此, 大

部分磷肥作为无效态(难溶态)在土壤中积累<sup>[2]</sup>。由于长期施用磷肥, 事实上大多数农田土壤潜在的磷库很大, 而提供作物生长发育的磷量却很小, 土壤缺磷是“遗传学缺磷”而非“土壤学缺磷”<sup>[3]</sup>。提高磷的利用率一直是农业科技工作者研究的热点课题之一。

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资助项目(No. 2007hzs1J011); 国家科技支撑计划(No. 2007BAD48B04); 公益性行业(农业)科研专项(No. nyhyzx07-033-2-3)

\* 通讯作者: Tel: 0898-23300371; ✉: zhengfucong@126.com

收稿日期: 2008-01-16; 接受日期: 2008-03-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

磷是许多发展中国家农业生产重要的限制因素, 提高土壤中磷的利用效率将具有战略性意义。土壤中存在大量的微生物, 通过释放有机酸、碳酸、硝酸和硫酸, 提高难溶性磷酸盐的溶解性, 从而改善作物磷素营养, 这些微生物统称为解磷菌或溶磷菌<sup>[1]</sup>。

本研究以有机磷细菌液体培养基进行富集, 然后以无机磷细菌固体培养基通过平板稀释法进行筛选, 初步建立了一种从土壤中分离筛选解磷细菌的方法, 并对其中溶磷能力比较强的菌株 PSB3 进行分子鉴定及拮抗作用的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

1.1.1 土样: 土样采自海南岛内橡胶树、大王棕、木薯、香蕉、甘蔗、辣椒、玉米、花生、大豆等作物的根际土壤, 采样深度 5 cm~20 cm。将野外采集回来的土样风干, 用研钵研细过筛(200 目)后贮存于塑料袋并编号, 置于冰箱保存备用。

1.1.2 供试菌种: 12 株供试真菌病原菌由环境与植物保护研究所提供, 其中 *Fusarium solani* 菌株 2 个(F19, F42); *Fusarium oxysporum* f. sp. Vanille 菌株 3 个(Fx31, Fx102, VF9903); *Fusarium oxysporum* Schl. f. sp. 菌株 3 个(92PFR1, 920028, 940802); *Colletotrichum gloeosporioides*(penz.) sacc 菌株 4 个(HR31, HS28, ZR75, DR10)。

1.1.3 培养基: 基本培养基为无机磷细菌培养基和有机磷细菌培养基<sup>[4,5]</sup>。其具体培养基配方为:

无机磷细菌液体培养基: 葡萄糖 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g, Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> 10 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.03 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.5。

有机磷细菌液体培养基: 葡萄糖 10 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 g, NaCl 0.3 g, KCl 0.3 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.03 g, MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.03 g, CaCO<sub>3</sub> 5.0 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, 加蛋黄液 10 mL (蛋黄液为无菌生理盐水与鸡蛋黄 1:1 配制), 蒸馏水 1 L, pH 7.0~7.5。

无机磷细菌固体培养基: 无机磷细菌液体培养基的基础上加入琼脂粉 18 g/L~20 g/L。

有机磷细菌固体培养基: 有机磷细菌液体培养基的基础上加入琼脂粉 18 g/L~20 g/L。

1.1.4 试剂: Taq DNA 聚合酶、dNTPs mixture、pMD18-T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司, 其它常规试剂为国产分析纯。

### 1.2 方法

1.2.1 解磷细菌筛选体系的建立: 称取 1 g 过 200 目筛的风干土壤于 100 mL 无机磷或有机磷液体培养基中, 28 ℃ 下, 200 r/min~250 r/min 培养 48 h。采用 10 倍稀释法将此土壤悬浮液稀释至 10<sup>-7</sup>, 取 10<sup>-3</sup>~10<sup>-7</sup> 5 个浓度的稀释液 100 μL 均匀涂布于无机磷或有机磷固体培养基平板, 28 ℃ 恒温培养 3 d~5 d, 每个稀释度做 3 个重复。观察平板中菌落生长情况及溶磷圈的产生, 并挑取具有溶磷圈的单菌落分别在无机磷细菌固体培养基平板上进行划线分离及纯化, 以获得纯菌株。

1.2.2 解磷能力的测定: 1) 固体培养条件下溶磷能力测定。采用溶磷圈法。将菌株 PSB3 单菌落接种于固体培养基平板上, 并以 1 个在初筛平板中不产生解磷圈的菌株为对照, 重复 3 次, 28 ℃ 恒温培养 7 d, 根据溶磷圈直径与菌落直径的比值(HD/CD)大小初步确定该菌株解磷能力的强弱。

2) 液体培养条件下溶磷能力测定。挑取菌株 PSB3 单菌落接种到 100 mL 无机磷液体培养基, 以不产生解磷圈的菌株为对照, 28 ℃, 200 r/min~250 r/min 振荡培养, 每隔 24 h 取其上清液, 用钼蓝比色法<sup>[6]</sup>测定培养液中的有效含磷量。连续测定 7 d。

1.2.3 PSB3 的分子鉴定: 1) 细菌菌液的制备。从划线培养的平板上挑取单菌落接种到 100 mL LB 液体培养基中, 37 ℃, 200 r/min~300 r/min 振荡培养过夜。

2) 引物设计及 PCR 反应。所用引物为细菌 16S rDNA 通用引物<sup>[7]</sup>:

P1: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

P2: 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'

引物由北京赛百盛基因技术有限公司合成。配成 100 ppm 的母液备用。预期获得 1500 bp 左右的片段。

反应体系: 25 μL 体系中含有 10×PCR buffer 2.5 μL, dNTPs(各 2.5 mmol/L)2.0 μL, P1(10 ppm) 1.0 μL, P2(10 ppm) 1.0 μL, 菌液 1.0 μL, Taq 酶 (5 U/μL)0.2 μL, ddH<sub>2</sub>O 17.3 μL。

反应条件: 94 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 64 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 30 个循环; 72 ℃ 10 min。

PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

3) PCR 产物的回收及连接转化。PCR 产物的回收按照 TaKaRa PCR Fragment recovery kit 说明书进行。

取 1.0  $\mu\text{L}$  PCR 回收产物与克隆载体 PMD 18-T vector 连接, 5  $\mu\text{L}$  连接反应体系中含有 PMD 18-T vector 0.5  $\mu\text{L}$ , ligation solution 2.5  $\mu\text{L}$ , PCR 产物 1.0  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 1.0  $\mu\text{L}$ 。充分混匀后离心数秒, 将管壁液滴收到管底, 16  $^{\circ}\text{C}$  水浴 16 h~18 h。

将连接产物转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞, 涂平板, 待菌液吸干后倒置平板于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养 12 h~16 h; 随机挑取白色单菌落到含有 Amp 50 mg/L 的 LB 液体培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min~300 r/min 振荡培养过夜, 然后以 1  $\mu\text{L}$  菌液为模板进行 PCR 扩增反应, 同时以无菌水为模板设为对照。反应体系及反应条件同 1.2.3。

4) PSB3 16S rDNA 序列分析。将阳性克隆穿刺培养, 寄往上海生工生物工程技术有限公司进行测序。测序结果通过 GenBank 中的 Blastn 搜索数据库进行序列的同源性比较分析。

1.2.4 拮抗作用: 按 5 点接菌法将供试菌株(炭疽菌和镰刀菌)接在 PDA 平板中央, PSB3 对称接于四

周。每个处理做 3 个重复, 在 28  $^{\circ}\text{C}$  条件下, 倒置培养 7 d~10 d。

## 2 结果分析

### 2.1 不同培养基组合的筛选效果比较

通过有机磷液体培养基和无机磷液体培养进行生物富集后, 在有机磷固体培养基平板和无机磷固体培养基平板上涂板, 结果显示, 4 种方法组合中, 方法 1(有机磷培养基富集和筛选)的平板上长满厚厚的一层菌, 没有单菌落, 也不产生透明圈(见图 1-D); 方法 2(有机磷培养基富集, 无机磷培养基筛选)的平板上, 菌落较疏, 较大, 易于挑取单菌落做后续研究, 且各个菌落周围出现明显的透明圈(见图 1-B); 方法 3(无机磷培养基富集, 有机磷培养基筛选)的平板上有单菌落, 且菌落较大, 但菌落周围无透明圈(见图 1-C); 方法 4(无机磷培养基富集和筛选)获得了单菌落, 并且有溶磷圈的产生, 但单菌落分布较密, 溶磷圈极小(见图 1-A)。

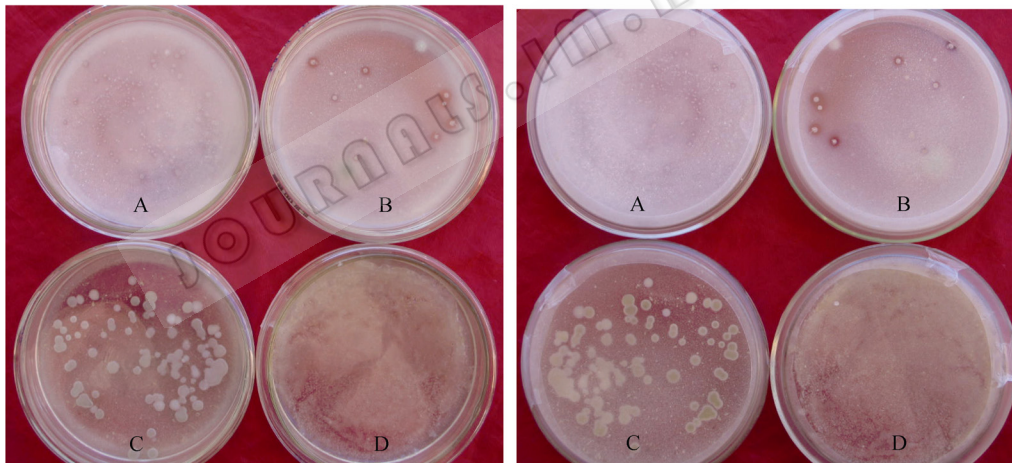


图 1 4 种不同培养基组合筛选效果

Fig. 1 The screening effect of 4 culture medium combination

注: 左: 正面; 右: 反面

Note: Left: Frontage; Right: Reverse side

通过平板稀释法, 共分离到 107 株具有解磷能力的细菌菌株, 方法 1 获得 0 个菌株, 方法 2 获得 77 个菌株, 占总菌株数的 71.96%; 方法 3 获得 1 个菌株, 占总菌株数的 0.94%; 方法 4 获得 29 个菌株, 占总菌株数的 27.10%。

根据以上结果, 我们确定方法 2, 即以有机磷液体培养基作为生物富集用培养基, 然后在无机磷

固体培养基平板上进行平板稀释, 为解磷细菌的筛选体系。

### 2.2 PSB3 解磷能力的测定

2.2.1 固体培养条件下解磷能力的测定: 将 PSB3 及对照点接到无机磷固体培养基平板上, 重复 3 次, 培养 7 d 后, 测其溶磷圈直径与菌落直径, 根据 HD/CD(HD 为溶磷圈直径, CD 为菌落直径)值确定

该菌株的解磷能力。其中对照的 HD/CD 值为 1.0(0.82/0.82), PSB3 的 HD/CD 值为 4.13(3.1/0.75) (见图 2)。

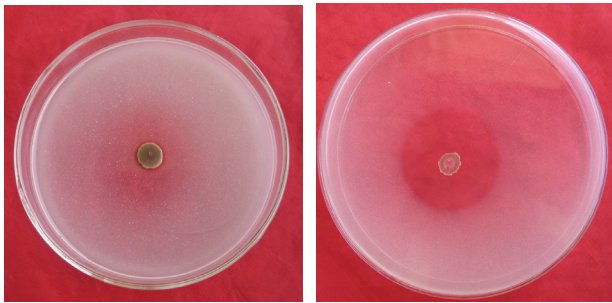


图 2 溶磷圈的观察

Fig. 2 The halo of Phosphate-solubilization produced by PSB3

注: 左: 对照; 右: PSB3

Note: Left: Control; Right: PSB3

2.2.2 液体培养条件下解磷能力的测定: 通过钼蓝比色法测定了培养液中的有效含磷量, 连续测定 7 d, 对照组中由于接种的是不产生解磷圈的菌株, 培养基里的游离态磷含量很低, 而且基本维持在一个低水平上; 随着时间的延长, PSB3 菌株上清液含磷量逐渐增加, 第 4 天出现峰值, 为 218.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。出现峰值后, 含磷量开始下降, 之后趋于稳定(见图 3)。

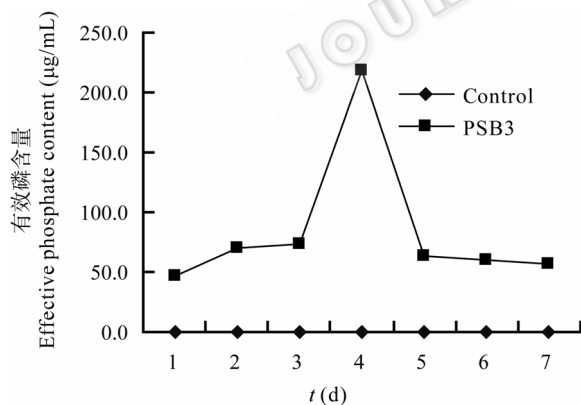


图 3 PSB3 上清液有效磷含量随时间变化趋势

Fig. 3 The effective phosphate content of PSB3 with the change of time

菌液中的磷含量随时间变化而变化, 解磷菌在无机液体培养基里生长, 在一定的时间内, 培养基里面的营养能满足菌液里解磷菌的生理需要, 解磷菌因此大量繁殖, 解磷能力加强, 培养液上清的含磷量随时间延长而增加; 随着时间的继续延长, 培

养基里面的营养逐渐被细菌消耗, 而培养基里的磷元素含量是有限的, 因此, 一定时间后, 菌液中的磷含量反而会有所降低。

### 2.3 PCR 产物电泳及回收

PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(见图 4), 获得了约 1500 bp 大小的片段。

### 2.4 转化子的菌落 PCR 检测

随机挑取 4 个白色菌落培养菌液为模板进行 PCR 扩增, 以水为模板设为对照, PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测(见图 5)。所挑选的转化子均扩增得到 1500 bp 左右的条带, 为阳性克隆。

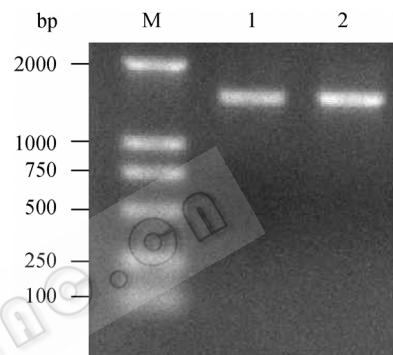


图 4 PCR 产物电泳图谱

Fig. 4 The electrophoresis map of PCR products

M: DNA Marker DL2000; 1: PCR product

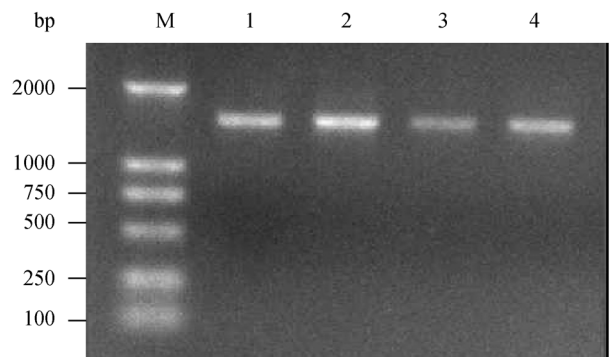


图 5 转化子 PCR 检测电泳图谱

Fig. 5 The electrophoresis map of transformants bacteria liquid PCR

M: DNA Marker DL2000; 1~4: PCR products of transformants

### 2.5 序列分析

挑选 1 个阳性克隆, 寄往上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 测序结果为, 所获得的基因片段为 1525 bp, 通过 Blastn 搜索, 该菌株为洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*), 将该序列提交到 GenBank(登录号: EU305400)。

## 2.6 拮抗作用

通过 PSB3 对 12 个镰刀菌和炭疽菌菌株的室内平板对峙试验, 菌株 PSB3 在培养基平板中能够较好的抑制其中 6 个真菌菌丝的生长, 真菌菌落形态有变

异, 趋向于向十字形菌落发展, FX102 和 VF9903 2 个菌株的菌落出现明显的十字形, 且各个真菌菌落与 PSB3 菌落间不融合, 有较明显的抑菌带, 说明 PSB3 对 F19 等 6 个菌株有不同程度的拮抗作用(见图 6)。

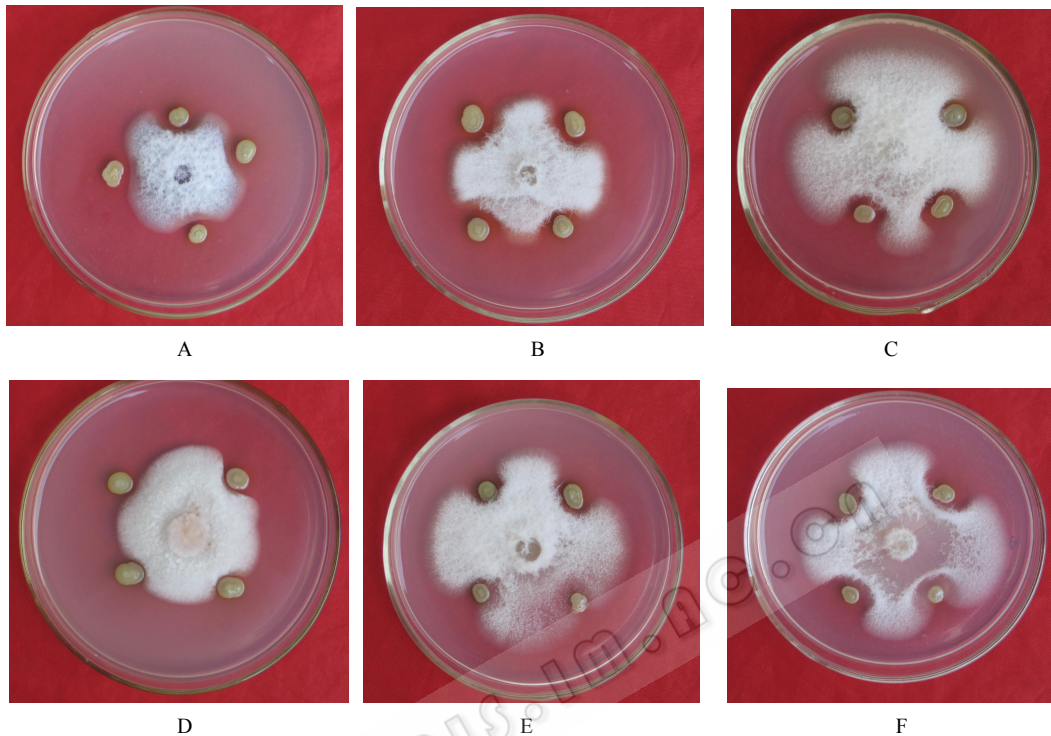


图 6 解磷菌 PSB3 对 F19 等菌株的拮抗作用

Fig. 6 The antagonism of PSB3 to 6 Fungal strains

A: F19; B: F42; C: FX31; D: ZR75; E: FX102; F: VF9903

## 3 讨论

有机磷细菌培养基与无机磷细菌培养基成分的差别在于磷源的不同, 前者加入了蛋黄, 蛋黄的营养极其丰富, 含有许多可供细菌生长的营养成分, 用有机磷细菌液体培养基来进行生物富集, 可为细菌提供丰富的营养。而平板稀释法筛选时, 由于蛋黄营养过于丰富, 以致于在平板上长出很多杂菌, 且菌落过密而不利于筛选, 影响解磷菌筛选的效果。因此有机磷培养基适合用来富集, 而无机磷培养基比较简单的成分限制了非解磷细菌的生长, 适用于平板筛选, 这样就提高了解磷菌分离筛选的效率和准确性。

微生物的解磷能力有 3 种测定方法<sup>[8,9]</sup>: 1) 将解磷菌株在含有难溶性磷酸盐的固体培养基上培养, 测定菌落周围产生的透明圈的大小; 2) 进行液体培

养, 测定培养液中可溶性磷的含量; 3) 进行土壤培养, 测定其有效磷的含量。本研究通过第 1 种和第 2 种方法测定了解磷菌菌株 PSB3 的解磷能力, 结果显示 PSB3 具有较强的解磷能力。

范丙全等<sup>[10]</sup>在测定溶磷草酸霉菌溶磷圈时得出培养 7 d 时的 HD/CD 值在 1.07~1.26 之间。林启美等<sup>[11]</sup>测得假单胞菌属培养 7 d 时溶磷圈的 HD/CD 值在 1.00~3.50 之间; 芽孢杆菌属培养 7 d 时溶磷圈的 HD/CD 值范围是 1.14~1.43。而本研究中, PSB3 菌株培养 7 d 的溶磷圈 HD/CD 值为 4.13, 远高于范丙全等, 林启美等的研究结果。林启美等<sup>[11]</sup>从土壤中分离的溶磷细菌在以磷矿粉作为磷源摇瓶培养 5 d 后, 菌株溶磷量最高达 11.73 mg/L。SUNDARA RAO 等<sup>[12]</sup>把磷酸钙作为磷源摇瓶培养 14 d 后, 发现几株芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)溶磷菌溶磷量范围是 70.52 mg/L~156.80 mg/L。而本研究中, PSB3 的培养

液上清含磷量明显高于对照, 含磷量峰值达到 218.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。上述结果说明菌株 PSB3 有较强的解磷能力。

生物防治作为病害防治方法之一, 具有良好的防治效果。特别是细菌的作用是非常明显的, 具有细菌的种类和数量众多; 对病原菌的作用方式较广; 具有惊人的繁殖速度; 存在于植物根系和地上部, 对植物的生态适宜; 可以人工培养, 便于控制, 在实践中易于操作; 不仅能防治病害而且可以增加作物产量等优势<sup>[13]</sup>。解磷菌作为一类重要的植物促生菌, 可生产大量的有机酸, 使土壤中不溶性磷溶解, 从而加速土壤中无效磷的有效化, 增加土壤中磷对作物的供应<sup>[14]</sup>。

通过本研究, 我们初步建立了“用有机磷液体细菌培养基富集, 再用无机磷固体细菌培养基分离筛选”的筛选体系, 并对产生较大解磷圈的菌株 PSB3 在固体条件下和液体条件下的解磷能力进行了测定, 结果显示, 该菌株有较强的解磷能力, 进一步证明了该体系的可行性和可操作性。拮抗试验结果表明, 菌株 PSB3 对常见病原菌有不同程度的拮抗作用。

对于该菌株对其他病原菌的拮抗作用及其实际田间生防效果等有待于进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料, 2001, 5(3): 7-11.
- [2] 王光华, 周克琴, 金 剑, 等. 不同碳源对三种溶磷真菌溶解磷矿粉能力的影响. 生态学杂志, 2004, 23(2): 32-36.
- [3] 王庆仁, 李继云, 李振声. 植物高效利用土壤难溶态磷研究动态及展望. 植物营养与肥料学报, 1998, 4(2): 107-116.
- [4] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985, pp.50-51.
- [5] 李阜隶, 俞子牛, 何绍红. 农业微生物学实验技术. 北京: 中国农业出版社, 1996, pp.87-88.
- [6] 许光辉, 郑洪光. 土壤微生物分析方法手册. 北京: 农业出版社, 1986, pp.168-171.
- [7] Ramos Solano B, Pereyra de la Iglesia MT, Probanza A, et al. Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded mediterranean ecosystems. *Plant and Soil*, 2006, 287: 59-68.
- [8] 赵小蓉, 林启美, 孙焱鑫. 细菌解磷能力的测定方法的研究. 微生物学通报, 2001, 28(1): 1-4.
- [9] Kucey RMN, Janzen HH, Legett ME. Microbially mediated increases in plant available phosphorus. *Adv Agron*, 1989, 42: 199-228.
- [10] 范丙全, 金继运, 葛 诚. 溶解草酸青霉菌筛选及其溶磷效果的初步研究. 中国农业科学, 2002, 35(5): 525-530.
- [11] 林启美, 赵小蓉, 孙焱鑫, 等. 四种不同生态环境土壤中解磷细菌的数量及种群分布. 土壤与环境, 2000, 9(1): 34-37.
- [12] SUNDARA-RAO WVB, SINHA MK. Phosphate dissolving microorganisms in the rhizosphere and soil. *Indian Journal of Agricultural Science*, 1963, 33(4): 272-278.
- [13] 程 亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.
- [14] 黄晓东, 季尚宁, Bernard Glick, 等. 植物促生菌及其促生理理. 现代化农业, 2002, 7: 7, 13-15.