

伍善东, 刘清术, 付祖姣, 等. 解有机磷拮抗细菌的筛选及其解磷特性和拮抗作用[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(4): 843-847.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.04.018

解有机磷拮抗细菌的筛选及其解磷特性和拮抗作用

伍善东, 刘清术, 付祖姣, 郭照辉, 孔利华, 单世平, 曾 奥
(湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009)

摘要: 为了获得高效解有机磷细菌, 从油菜地土壤中分离到 4 株对卵磷脂有不同降解能力的细菌。解有机磷细菌发酵上清液中有效磷含量为 8.59~28.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 较 CK 上清液中有效磷含量增加 8.03~27.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 其中菌株 JYP-3 解磷能力最强, 其发酵上清液中有效磷含量为 28.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 比对照增加 27.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。结合解有机磷细菌的菌落形态特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列分析结果, 初步确定菌株 JYP-1、JYP-4 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), JYP-2、JYP-3 为桥石短芽孢杆菌 (*Brevibacillus choshinensis*)。菌株 JYP-3 对水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)、烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 有较强的拮抗作用, 对黄瓜疫病病菌 (*Phytophthora melonis*) 没有拮抗作用。

关键词: 解有机磷细菌; 解磷能力; 拮抗作用

中图分类号: S154.38⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-4440(2017)04-0843-05

Screening of the bacteria-degrading organic phosphate and their degradative characteristics and antagonism

WU Shan-dong, LIU Qing-shu, FU Zu-jiao, GUO Zhao-hui, KONG Li-hua, SHAN Shi-ping, ZENG Ao
(Hunan Institute of Microbiology, Changsha 410009, China)

Abstract: Four organic-phosphate degrading bacteria with different degradation abilities to lecithin were isolated from the soil of rapeseed fields. The available phosphorus content in the supernatant of the four bacteria ranged from 8.59 to 28.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 8.03~27.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$ higher than that in the supernatant of CK. Strain JYP-3 showed the strongest phosphate degrading ability whose phosphorus content in the fermentation supernatant was 28.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Together with colony morphology and physiological and biochemical characteristics, 16S rDNA sequence analysis revealed JYP-1 and JYP-4 as *Bacillus subtilis* and JYP-2 and JYP-3 as *Brevibacillus choshinensis*. The fermentation filtrate of strain JYP-3 has strong antagonistic effect on *Rhizoctonia solani* and *Ralstonia nacearum*, but no antagonistic action on *Phytophthora melonis*.

Key words: organic-phosphate degrading bacterium; phosphate degrading capacity; antagonistic effect

磷是植物生长必需的营养元素之一, 中国有 74% 的耕地土壤缺磷^[1], 土壤中 95% 以上的磷以难溶的无机物和有机物存在, 而难被植物直接吸收利用, 其中有机态磷约占土壤全磷量的 20%~50%^[2]。生产上通常施用化学磷肥来补充作物所需的磷元

素, 由于长期施用磷肥, 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”^[3]。土壤中存在大量的微生物, 能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态, 具有这种能力的微生物称为解磷菌或溶磷菌^[1]。解有机磷细菌主要是芽孢杆菌属, 溶磷量为 4.4~26.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ^[4]。有关解磷菌的报道较多^[5-10], 具有解有机磷功能并对病原菌有拮抗作用的菌株却鲜见报道。

本研究的主要目的是为了获得高效解有机磷拮抗细菌, 配合解无机磷细菌研制成生物有机肥, 可以

收稿日期: 2017-02-23

基金项目: 湖南省科技计划项目 (2015NK3056)

作者简介: 伍善东 (1978-), 男, 湖南绥宁人, 本科, 工程师, 主要从事植物保护与微生物肥料研究。 (E-mail) 1059995305@qq.com

通讯作者: 单世平, (E-mail) ssp312@hotmail.com

提高植物对土壤中磷的利用,又能对一些病害起到一定的控制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品 采自益阳和长沙近郊的油菜地,采样深度 5~20 cm。土样自然风干,用研钵研细过 100 目筛后贮存于塑料袋中,置于 4 ℃ 冰箱保存备用。

1.1.2 培养基 有机磷培养基参照文献[11],PDA 培养基参照文献[12],NA 培养基、LB 培养基参照文献[13]。

1.1.3 供试病原菌 供试病原菌由湖南省微生物研究院提供,分别为水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*),黄瓜疫病菌(*Phytophthora melonis*),烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)。

1.2 解有机磷细菌的分离

解有机磷细菌的分离参照文献[11]的方法。

1.3 解有机磷细菌的复筛^[14]

采用溶磷圈法,将待测菌株点接于有机磷固体培养基上,以 1 个在初筛试验中没有透明圈的菌株为对照,3 次重复,30 ℃ 的恒温箱中培养 5~7 d,根据透明圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)大小初步确定菌株解磷能力的强弱。

1.4 解有机磷细菌的解磷能力分析^[15]

待测菌株接种于 50 ml LB 液体培养基中,30 ℃ 恒温,180 r/min 摇床振荡培养 18 h,按 1% 的接种量将上述种子液接入 50 ml 灭菌有机磷液体培养基中,对照接入等量的灭活种子液,3 次重复,30 ℃ 恒温,180 r/min 摇床振荡培养 4 d^[16],将发酵培养液在 4 ℃,以 6 000 r/min 转速离心 15 min,收集上清液,取 1 ml 上清液稀释适当倍数后用钼锑抗比色法测有效磷含量。

1.5 解有机磷细菌的拮抗试验

1.5.1 待测菌株无菌滤液的制备 无菌滤液的制备参照文献[17]的方法。

1.5.2 待测菌株与病原真菌的拮抗试验 将病原真菌接种于 PDA 培养基平皿中央,在四周呈等边三角形摆放 3 个牛津杯,每个牛津杯中加入 100 μ l 无菌滤液,28 ℃ 恒温箱中培养 3~7 d,测量透明带宽度的大小。

1.5.3 待测菌株与病原细菌的拮抗试验 挑一环病原细菌于 5 ml 无菌水中,菌数约 1×10^6 CFU/ml,振荡均匀,吸取 100 μ l 加入平皿中,再倒入 15 ml、45 ℃ 左

右的 NA 培养基,混合均匀,待培养基凝固后摆上 3 个牛津杯,每个牛津杯中加入 100 μ l 无菌滤液,28 ℃ 恒温箱中培养 2~3 d,测量透明圈直径的大小。

1.6 解有机磷拮抗细菌的鉴定

1.6.1 菌株的菌落形态特征 菌株划线接种于 LB 固体培养基上,30 ℃ 恒温培养 2 d,观察菌落形状、大小、颜色、是否透明、隆起程度、边缘特征等,革兰氏染色,光学显微镜镜检。

1.6.2 菌株的生理生化特征 按照东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[18]进行。

1.6.3 菌株的分子鉴定^[19] 提取菌株的 DNA 后,采用细菌通用引物 27F/1492R 进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物通过 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,送生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定,序列通过 Blast 程序与 GenBank 中数据进行比对分析,选择同源性高的序列使用 MEGA5.1 软件邻接法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 解有机磷细菌的筛选

经过初步筛选,挑选到 4 株在有机磷培养基上有明显透明圈的细菌,分别命名为 JYP-1、JYP-2、JYP-3、JYP-4,划线纯化后,通过溶磷圈法,测量各菌株透明圈直径的大小,其中透明圈直径最大的是 JYP-1,为 22.4 mm,透明圈直径最小的是 JYP-2,为 14.3 mm。菌株 JYP-3 透明圈直径为 19.1 mm,菌落直径为 3.5 mm, D/d 值最大,为 5.5。解磷菌株 D/d 值从大至小依次为 JYP-3>JYP-1>JYP-2>JYP-4(表 1)。

表 1 解有机磷细菌的筛选结果

Table 1 Screening of organic-phosphate degrading bacteria

菌株	透明圈直径 (mm)	菌落直径 (mm)	D/d
JYP-1	22.4	6.2	3.6
JYP-2	14.3	4.2	3.4
JYP-3	19.1	3.5	5.5
JYP-4	15.9	5.4	2.9

2.2 解有机磷细菌的解磷能力

解有机磷细菌发酵上清液中有效磷含量为 8.59~28.34 μ g/ml,CK 上清液中有效磷含量为 0.56

μg/ml,上清液中有效磷增加量为 8.03~ 27.78 μg/ml,其中 JYP-3 发酵上清液中有效磷含量最大,为 28.34 μg/ml,较 CK 增加 27.78 μg/ml。解磷菌株发酵上清液中有效磷含量从大至小依次为 JYP-3> JYP-2>JYP-1>JYP-4(表 2)。从表 1 和表 2 中可知,菌株 *D/d* 值和溶磷量之间并不总是呈正相关。

表 2 不同细菌对有机磷的降解能力

菌株	上清液中有效磷含量 (μg/ml)	有效磷增加量 (μg/ml)
CK	0.56	—
JYP-1	14.36	13.80
JYP-2	16.73	16.17
JYP-3	28.34	27.78
JYP-4	8.59	8.03

2.3 解有机磷细菌与病原真菌的拮抗作用

菌株 JYP-1、JYP-2、JYP-4 发酵无菌滤液对水稻纹枯病菌、黄瓜疫病菌均没有明显的拮抗作用;菌株 JYP-3 发酵无菌滤液对水稻纹枯病菌有明显的拮抗作用,透明带宽度为 4 mm(图 1),菌株 JYP-3 发酵无菌滤液对黄瓜疫病菌没有拮抗作用。

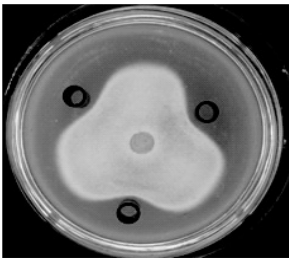


图 1 JYP-3 发酵无菌滤液对水稻纹枯病菌的拮抗作用

Fig.1 Antagonistic activity of JYP-3 fermented aseptic filtrate on *Rhizoctonia solani*

2.4 解有机磷细菌与病原细菌的拮抗作用

菌株 JYP-1、JYP-2、JYP-4 发酵无菌滤液对烟草青枯病菌没有明显的拮抗作用;菌株 JYP-3 发酵无菌滤液对烟草青枯病菌有非常明显的拮抗作用,在杯碟法试验中,透明圈直径达 19.8 mm(图 2)。

2.5 解有机磷细菌的鉴定

将菌株划线接种于 LB 固体培养基上,30 ℃ 恒温培养 2 d,解有机磷细菌 JYP-1、JYP-2、JYP-3、JYP-4 经镜检均为革兰氏阳性细菌,有芽孢,菌落形态特征见表 3。生理生化特征见表 4。

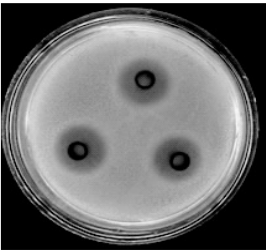


图 2 JYP-3 发酵无菌滤液对烟草青枯病菌的拮抗作用

Fig.2 Antagonistic activity of JYP-3 fermented aseptic filtrate on *Ralstonia solanacearum*

表 3 解有机磷细菌的形态特征

Table 3 Morphological characteristics of organic-phosphate degrading bacteria

菌株	菌落特征
JYP-1	菌落圆形,乳白色,无光泽,表面有皱褶,边缘不整齐。
JYP-2	菌落平滑、粘稠,黄色,边缘整齐,无可溶性色素。
JYP-3	菌落光滑、湿润粘稠,边缘整齐,黄灰色,无可溶性色素。
JYP-4	菌落近圆形或不规则形,乳白色,有皱褶,边缘呈锯齿状。

表 4 解有机磷细菌的生理生化特征

Table 4 Physiological-biochemical characteristics of organic-phosphate degrading bacteria

项目	JYP-1	JYP-2	JYP-3	JYP-4
葡萄糖	+	+	+	+
果糖	+	+	+	+
甘油	-	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+
甘露糖	+	+	+	+
阿拉伯糖	+	-	-	-
木糖	+	+	-	+
乳糖	-	-	-	-
明胶液化	+	+	+	+
淀粉水解	+	-	-	+
硫化氢试验	-	-	-	-
吲哚试验	-	-	-	-
氧化酶	-	+	+	-
硝酸盐还原	+	-	-	+
V-P 试验	+	-	-	+
柠檬酸盐利用	+	+	+	+
2%氯化钠	+	-	-	+
pH5.5	+	-	-	+

“+”表示阳性;“-”表示阴性。

将解有机磷细菌的 16S rDNA 基因序列提交至 GenBank 数据库进行比对, JYP-1、JYP-4 与枯草芽孢杆菌同源性均为 99%, JYP-2、JYP-3 与桥石短芽孢杆菌同源性均为 99%, 选择相似性较高的菌株用 MEGA5.1 软件建立系统发育树(图 3、图 4)。结合

解有机磷拮抗细菌的菌落形态特征和生理生化特征及 16S rDNA 序列分析, 初步确定菌株 JYP-1、JYP-4 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*), JYP-2、JYP-3 为桥石短芽孢杆菌(*Brevibacillus choshinensis*)。

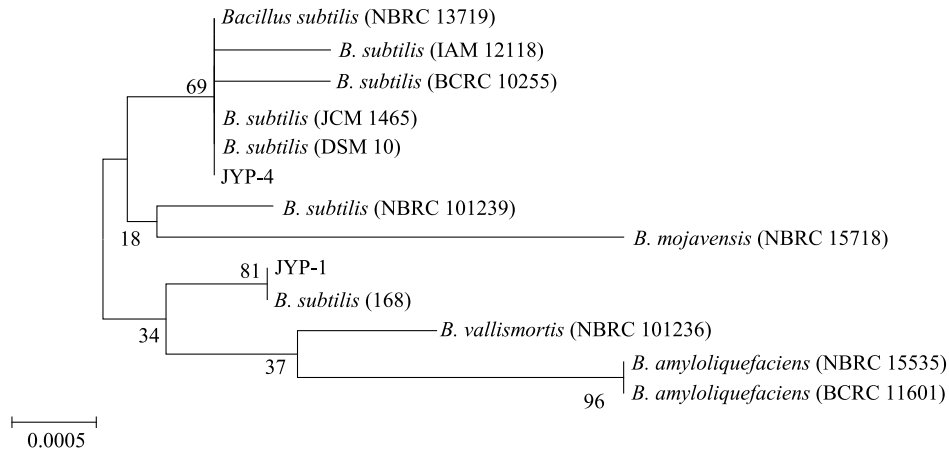


图 3 以菌株 JYP-1、JYP-4 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strains JYP-1 and JYP-4

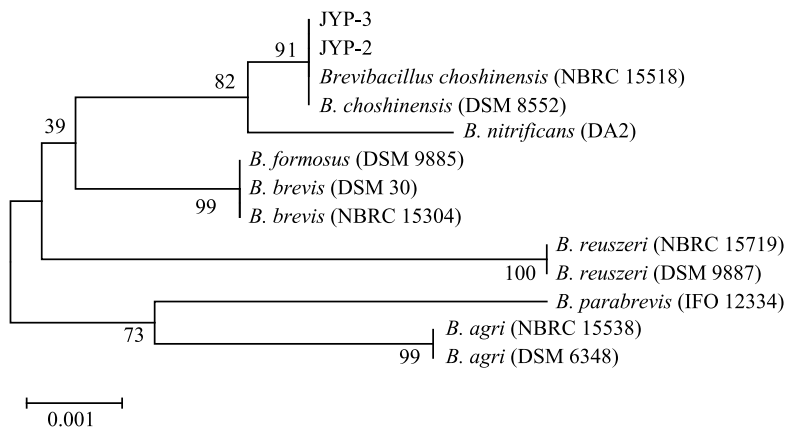


图 4 以菌株 JYP-2、JYP-3 16S rDNA 序列为基础构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strains JYP-2 and JYP-3

3 讨论

本试验筛选到 4 株解有机磷细菌, 其中菌株 JYP-3 的 D/d 值最大, 为 5.5, 发酵上清液中有效磷含量也最大, 为 28.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 较 CK 增加 27.78 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 比较 4 株解有机磷细菌的 D/d 值与发酵上清液中有效磷含量之间的关系, 两者并不总是呈正相关, 这可能与解磷细菌在固体和液体不同环境的

培养过程中产生酶的种类或产生的酶量不同有关。有研究者认为, 解有机磷细菌在生长过程中可以产生各种酶类, 如磷酸酯酶、植酸酶、核酸酶等, 分泌到细胞外, 从而使土壤中有机磷酸盐被分解、矿化, 成为植物可以吸收利用的无机磷酸盐^[20]。有研究报道, 在枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中克隆到植酸酶基因, 并验证了该基因的功能^[21]。

生物防治作物病害具有众多的优点, 如对环境

污染小,成本低;生防菌的种类和数量多,生防资源丰富;生防菌可人工大量繁殖,易于操作;对病原菌的作用方式较广;促进作物生长和增加产量等。Vassileva 等^[22]认为,解磷细菌具有生防作用是因为代谢产物中存在吡啶乙酸,吡啶乙酸影响病原菌与植物间的相互作用,这可能与吡啶乙酸和谷胱甘肽转移酶同时参与植物的防御反应有关,也可能是吡啶乙酸能够抑制病原菌孢子萌发和菌丝生长有关。4 株解有机磷细菌中,菌株 JYP-3 对水稻纹枯病菌、烟草青枯病菌都具有较强的拮抗作用,其余 3 株对水稻纹枯病菌、烟草青枯病菌、黄瓜疫病病菌均没有明显的拮抗作用,对其他病原菌的拮抗作用及菌株 JYP-3 实际田间生防效果将是下一步的研究内容。

林启美等^[23]通过分析农田、林地、草地和菜地土壤,发现解有机磷细菌主要是芽孢杆菌属,其次是假单胞杆菌属。对 4 株解有机磷细菌进行鉴定,初步确定菌株 JYP-1、JYP-4 为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*),JYP-2、JYP-3 为桥石短芽孢杆菌(*B. choshinensis*)。

参考文献:

- [1] 赵小蓉,林启美.微生物解磷的研究进展[J].土壤肥料,2001(3):7-11.
- [2] 韩梅,温志丹,肖亦农,等.解磷细菌的筛选及对植物病原真菌的拮抗作用[J].沈阳农业大学学报,2009,40(5):594-597.
- [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[J].植物营养与肥料学报,1998,4(2):107-116.
- [4] TAO G C, TIAN S J, CAI M Y, et al. Phosphate-solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils[J]. Pedosphere, 2008, 18(4): 515-523.
- [5] 张云霞,雷鹏,许宗奇,等.一株高效解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 的筛选及其对土壤微生态和小麦生长的影响[J].江苏农业学报,2016,32(5):1073-1080.
- [6] 陈倩颖,胡子全,刘连生,等.6 株解有机磷细菌的分离鉴定[J].安徽农业大学学报,2009,36(3):417-421.
- [7] 任友花,王羿超,李娜,等.微生物肥料高效解磷菌筛选及解磷机理探究[J].江苏农业科学,2016,44(12):537-540.
- [8] 贺梦醒,高毅,胡正雪,等.解磷菌株 B25 的筛选、鉴定及其解磷能力[J].应用生态学报,2012,23(1):235-239.
- [9] 孙薇,谷洁,李玉娣,等.土壤有机磷降解菌的筛选、鉴定及其生长特性研究[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(2):235-239.
- [10] 伍善东,刘冬华,郭照辉,等.1 株高效解无机磷细菌 JP-7 的分离、鉴定及溶磷能力分析[J].江苏农业科学,2015,43(12):374-376.
- [11] 李文红,施积炎.西湖沉积物中解磷菌的分离纯化及其解磷能力[J].应用生态学报,2006,17(11):2112-2116.
- [12] 黄秀梨,夏立秋,辛明秀,等.微生物学实验指导[M].北京:高等教育出版社,1999.
- [13] 伍善东,雷平,郭照辉,等.1 株番茄青枯病内生拮抗细菌的分离鉴定及盆栽防效[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2016,42(6):627-630.
- [14] 伍善东,刘冬华,郭照辉,等.1 株高效解无机磷细菌 JP-7 的分离、鉴定及溶磷能力分析[J].江苏农业科学,2015,43(12):374-376.
- [15] 胡晓峰,郭晋云,张楠,等.一株溶磷抑病细菌的筛选及其溶磷特性[J].中国农业科学,2010,43(11):2253-2260.
- [16] 余贤美,王义,沈奇宾,等.解磷细菌 PSB3 的筛选及拮抗作用的研究[J].微生物学通报,2008,35(9):1398-1403.
- [17] 伍善东,刘冬华,郭照辉,等.黄瓜疫病菌拮抗细菌的分离及鉴定[J].安徽农业科学,2014,42(20):6692-6693.
- [18] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:370-398.
- [19] 伍善东,雷平,郭照辉,等.1 株高效解钾菌的分离、鉴定及培养条件优化[J].贵州农业科学,2016,44(5):77-80.
- [20] 姜成林,徐丽华.微生物资源学[M].北京:科学出版社,1997.
- [21] KEROVUO J, LAURAEUS M, NURMINEN P, et al. Isolation, characterization, molecular gene cloning, and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 2079-2085.
- [22] VASSILEVA N, VASSILEVA M, NIKOLAEVA I. Simultaneous p-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 71: 137-144.
- [23] 林启美,赵小蓉,孙众鑫,等.四种不同生态系统的土壤解磷细菌数量及种群分布[J].土壤与环境,2000,9(5):34-37.

(责任编辑:陈海霞)