

李丽丽,郎 敬,杨洪一,等.大豆根际解磷菌的鉴定[J].江苏农业科学,2014,42(8):363-365.

大豆根际解磷菌的鉴定

李丽丽^{1,2,3},郎 敬⁴,杨洪一⁴,邵飞飞⁴,来永才¹

(1. 黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所,黑龙江哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农业科学院博士后科研工作站,黑龙江哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省林业科学研究所,黑龙江哈尔滨 150081; 4. 东北林业大学生命科学学院,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:利用 PVK 平板,从大豆根际土壤中分离出 8 株解磷菌。培养分析结果显示,这 8 株解磷菌的溶磷圈均较大。其中,海伦Ⅲ号为革兰氏阴性菌,其余均为革兰氏阳性菌。形态学观察结果显示,北安Ⅰ号为链球菌,海伦Ⅱ号、海伦Ⅲ号为球菌,海伦Ⅳ号、北安Ⅲ号为杆菌。基于细菌核糖体 16S rDNA 序列对北安Ⅲ号菌株进行鉴定,结合形态特征确认该菌株为巨大芽孢杆菌,经研究发现该菌株是一种重要的微生物资源,可进一步开发为生物磷肥。

关键词:解磷菌;溶磷圈;16S rDNA;大豆;生物磷肥

中图分类号:S154.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)08-0363-03

土壤中存在一些特定的微生物,能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸收利用的形态,这些微生物被称为解磷菌,以细菌为主^[1]。将解磷菌作为肥料施入土壤,通过其生长代谢可以在作物根际形成一个磷供应较充分的微区,从而改善作物磷元素的供应,增加作物磷素吸收量,提高作物产量,同时还可以增进土壤肥力、增强植物抗病和抗旱能力^[2]。因此,解磷菌的筛选及鉴定是当前微生物学研究的热点。土壤中解磷微生物种类丰富、数量较多^[2],目前报道的具有解磷作用的细菌有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、固氮菌属(*Azotobacte*)、根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、硫杆菌属(*Thiobacillus*)、肠细菌属(*Enterobacter*)、微球菌属(*Micrococcus*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、色杆菌属(*Clomobacterium*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、节杆菌属(*Arthrobacte*)、大肠杆菌属(*Escherichia*)等^[3]。解磷微生物在我国应用较早,有较好的应用前景,但发展不快,应用还不普遍。筛选高效微生物肥料菌株手段单一、菌种种类少是影响微生物肥料发展的重要因素,因而有必要对土壤中的解磷菌进行大规模筛选,并进行系统鉴定,丰富菌种资源,但土壤中的细菌种类极为丰富,通过常规的形态学和生理生化方法难以进行有效的鉴定。笔者所在的实验室在前期研究中获得了 8 株解磷菌,本研究对这些分离到的解磷菌进行了形态观察及分子鉴定,为丰富解磷微生物菌种资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 染色及显微观察

利用革兰氏染色法^[4]对筛选到的高效解磷菌进行染色,

收稿日期:2014-02-06

基金项目:黑龙江省自然科学基金(编号:QC2011C110);黑龙江省哈尔滨市科技创新人才基金(编号:2012RFQYN023);中国博士后科学基金(编号:2011M500706,2012T50382);黑龙江省博士后科学基金(编号:LBH-Z11031);黑龙江省农业科学院博士后基金。

作者简介:李丽丽(1978—),女,辽宁阜新人,博士,助理研究员,主要从事微生物学研究。E-mail:lilili0622@126.com。

通信作者:杨洪一,博士,副教授,主要从事微生物学研究。E-mail:yhyil@sohu.com。

将菌液涂布于载玻片上,干燥,固定,结晶紫初染 1 min,水洗至无色;碘液媒染 1 min,水洗至无色;95%乙醇脱色 30 s,水洗至无色;最后沙黄复染 1 min,水洗至无色,干燥,镜检。

1.2 细菌总 DNA 的提取

接种菌株置于 LB 液体培养基中,于 130 r/min 下振荡,37 ℃ 过夜培养。取 1.5 mL 新鲜菌液于 EP 管中,于 4 000 r/min 离心 30 s,弃上清,收集菌体;加 100 μg/mL 溶菌酶 50 μL,于 37 ℃ 下处理 1 h 辅助裂解;加入预热的 CTAB 溶液 500 μL,充分混合,于 65 ℃ 水浴 30 min,混匀;冷却后,加入等体积的三氯甲烷/异戊醇(24:1)抽提,颠倒充分混合,10 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入等体积三氯甲烷/异戊醇(24:1),轻轻颠倒混匀,10 000 r/min 离心 5 min;取上清,加入 2 倍体积的无水乙醇,沉淀 30 min,8 000 r/min 离心 10 min;弃上清,用 70%乙醇洗涤沉淀 2 次;在超净工作台上风干 DNA,溶于 20 μL 去离子水中。

1.3 PCR 扩增

利用细菌核糖体 16S rDNA 通用引物 27F/1492R^[5]进行 PCR 反应,其反应体系 20 μL,包括 10 × PCR Buffer 2.0 μL、dNTP mix 1.6 μL、25 μmol/mL 引物 27F/1492R 各 0.4 μL、Taq DNA 聚合酶 1 U、模板 DNA 1 μL,去离子水补足至 20 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 1.5 min,30 次循环;72 ℃ 7 min;4 ℃ 保温。

1.4 回收及测序

利用琼脂糖凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行回收纯化,将纯化产物送至大连宝生物公司进行测序。利用 BLAST 工具在 GenBank 中对获得的序列进行分析^[6]。经过 NCBI 比对后下载相关菌株的细菌核糖体 16S rDNA 序列,所得序列用 Clustal X 1.81 程序进行多序列比对,并经手工校正;然后用软件 MEGA 3.1 构建系统发育树。

2 结果与分析

利用 PVK 平板,从大豆根际土壤中筛选出 8 株解磷菌,并将这 8 株解磷菌接种在固体 LB 培养基上,37 ℃ 恒温培养条件下菌株的溶磷圈均较大,菌落边缘呈规则的圆形,表面光滑,中心突起,分别编号为北安Ⅰ、北安Ⅱ、北安Ⅲ、北安Ⅳ、海

伦 I、海伦 II、海伦 III、海伦 IV (部分菌株菌落形态见图 1 至图 4)。由于培养基中加入了溴酚蓝,菌落吸附了染料呈蓝色,但一些菌株具有降解溴酚蓝的能力,如菌株海伦 II 号(图 4),蓝色较淡。

革兰氏染色结果显示,海伦 III 号为革兰氏阴性菌,其余均为革兰氏阳性菌。在光学显微镜下可有效观察到菌株的形态(部分菌株形态见图 5 至图 10),其中北安 I 号为链球菌,海伦 II 号、海伦 III 号为球菌,海伦 IV 号、北安 III 号为杆菌。



图1 北安 III 号

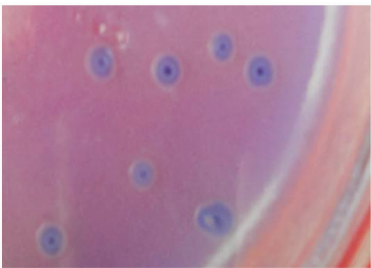


图2 海伦 III 号

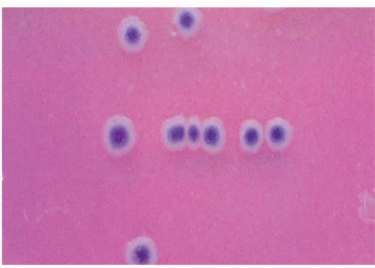


图3 海伦 I 号

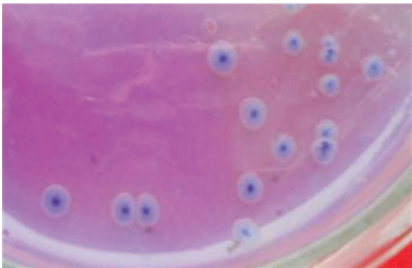


图4 海伦 II 号



图7 北安 III 号 (10×40)

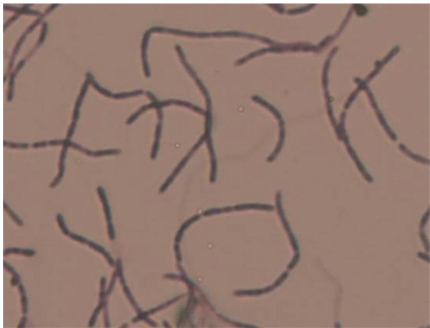


图5 北安 I 号 (10×40)



图8 北安 III 号 (10×100)



图6 北安 I 号 (10×100)

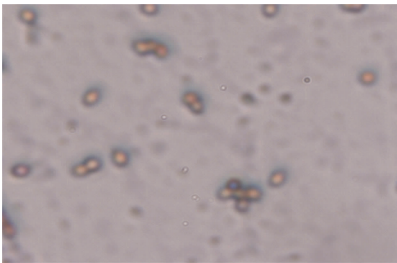


图9 海伦 III 号 (10×100)

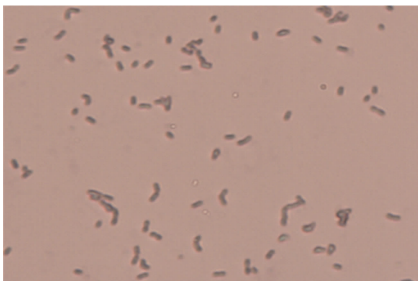
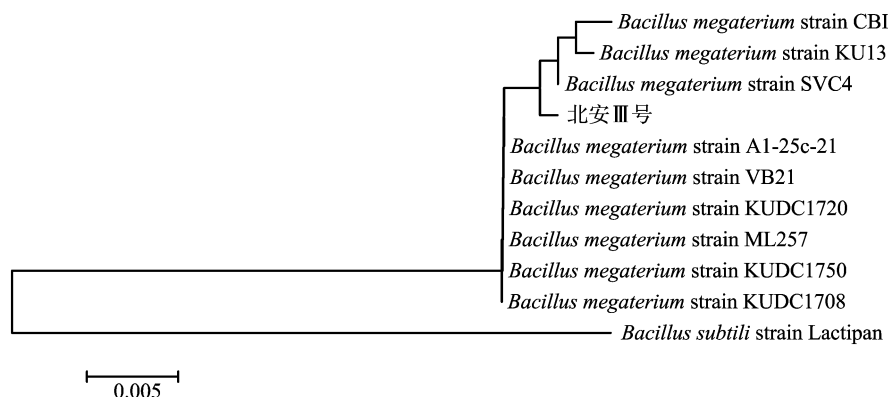


图10 海伦 IV 号 (10×40)

以菌株北安 III 号为试材,利用 CTAB 法提取细菌总 DNA,以此为模板,利用细菌 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增。对反应体系进行优化后,能稳定扩增出约 1 500 bp 的特异性片段。将 PCR 产物进行切胶回收纯化,将纯化产物送至宝生物工程(大连)公司进行测序。测序结果显示,该片段为细菌核糖体 16S rDNA 特异片段。经 BLAST 搜索显示其与芽孢杆菌属细菌 16SrDNA 序列相似性较高,

与巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 相似性最高, 为 99%; 系统进化分析结果显示其与 GenBank 中已报道的巨大芽孢

杆菌聚为一支 (图 11), 结合形态特征确认该菌为巨大芽孢杆菌。



以芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 作为外群; 北安Ⅲ号在进化树中与巨大芽孢杆菌聚为一支

图11 基于细菌核糖体 16S rDNA 序列的几株巨大芽孢杆菌的系统发育树

3 结论

利用 PVK 平板对解磷菌进行分离是一种简单有效的手段^[7], 一些菌株 (如芽孢杆菌属) 在其生长过程中可产酸, 将培养基中的磷酸钙溶解产生溶磷圈, 通过分析溶磷圈的大小可对微生物的溶磷能力进行初步估测。本研究中的菌株皆产生了较大的溶磷圈, 说明它们可能具有较强的溶磷潜力。本研究获得的解磷菌既有球菌, 又有杆菌, 但已有研究中分离及初步应用的解磷菌主要是杆菌, 因而本研究重点选择了一种杆菌——北安Ⅲ号进行细菌核糖体 16S rDNA 序列鉴定。结合形态学特点及细菌核糖体 16S rDNA 序列, 确定该菌为巨大芽孢杆菌。该菌是土壤中的重要菌群, 对农作物无害, 且可能具有一些有益生物学作用, 因而该菌株是一种重要的微生物资源, 可进一步开发为生物磷肥。

参考文献:

[1] 李晓婷. 解磷细菌 K3 的 GFP 标记与在土壤中定殖及对玉米生

(上接第 203 页)

[20] 王敏奇, 许梓荣. 饲料中添加锌对仔猪不同组织微量元素沉积的影响[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2002, 28(5): 90-95.

[21] 方洛云, 邹晓庭, 蒋林树, 等. 不同锌源对断奶仔猪生长性能和消化酶的影响[J]. 中国饲料, 2004(4): 20-22.

[22] Vallee B L, Falchuk K H. The biochemical basis of zinc physiology [J]. Physiological Reviews, 1993, 73(1): 79-118.

[23] Tapiero H, Tew K D. Trace elements in human physiology and

长效应研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2009: 1-5.

[2] Gyaneshwar P, Naresh K G, Parekh L J, et al. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants [J]. Plant and Soil, 2002, 245: 83-93.

[3] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion [J]. Biotechnology Advances, 1999, 17: 319-339.

[4] 万翠番, 章昭琳, 王报贵, 等. 高黏附力双歧杆菌的筛选与鉴定 [J]. 中国乳品工业, 2012(5): 13-15.

[5] Moreno C, Romero J, Romilio T E. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio* [J]. Microbiology, 2002, 148: 1233-1239.

[6] Altschul S F, Madden TL, Chffer A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(17): 3389-3402.

[7] Kucey R M N, Janzen H H, Legett M E. Microbially mediated increases in plant available phosphorus [J]. Advances in Agronomy, 1989, 42: 199-228.

pathology: zinc and metallothioneins [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2003, 57(9): 399-411.

[24] 高向华, 许并社, 魏丽乔, 等. 银型沸石抗菌剂的制备与性能研究 [J]. 太原理工大学学报, 2008, 39(5): 455-458.

[25] 余佳胜, 张继. 广东沸石饲养肉鸡的效果及机理 (三)——肉鸡料中沸石作用机理初探 [J]. 饲料研究, 1995(11): 8-10.

[26] 杨彩梅, 陈安国. 沸石对黄羽肉鸡的饲用效果及作用机理 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 1999, 25(6): 60-63.