

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.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.10.005

脐橙根际解磷菌的分离鉴定及全基因组测序分析

郭小丹^{1,2},唐 珊^{1,2},余水静^{1,2}

(1.江西理工大学资源与环境工程学院,江西赣州 341000;2.江西省矿冶环境污染控制重点实验室,江西赣州 341000)

摘要:高效解磷菌的分离,可促进实用型生物肥料的开发,是实现对作物的可持续性供磷以维护环境健康与土壤生产力的有力保障。以江西省赣州市某果园脐橙根际土壤作为试验材料,用平板筛选法筛选分离 12 株具有解磷能力的菌株,并结合钼锑抗比色法评估分离菌株的解磷能力,最终筛选出 3 株解磷菌(菌株编号为 QCGJ-B01、QCGJ-B02、QCGJ-B04),这些菌株表现出高溶磷指数(范围为 1.71~2.50)、强解磷能力(范围为 280.75~317.48 mg/L)、低 pH 值(范围为 4.08~4.77)。结果显示,pH 值与解磷量呈负相关,表明酸化是 3 株解磷菌解磷的主要机制。对解磷能力最强的 QCGJ-B01 进行全基因组测序分析,并基于管家基因鉴定得出,QCGJ-B01 是新洋葱伯克霍尔德菌。全基因组数据显示,QCGJ-B01 的基因组大小为 8 127 322 bp,G+C 含量为 66.98%,预测到 7 425 个基因,所有预测和注释的基因序列都分配到 KEGG 通路中,检测了有机酸合成与磷酸盐代谢相关基因。本研究发现,QCGJ-B01 具有无机磷溶溶基因(*gdh*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE*、*gltA*)和磷酸盐转运系统基因(*pstS*、*pstC*、*pstA*、*pstB*、*phoR*—*phoB*、*phoU*)。此外,本研究还发现 QCGJ-B01 缺乏矿化磷酸酯的基因和编码磷酸酯转运蛋白的基因,可能使其无法利用额外的有机磷源,不利于其在不存在有效磷的环境中生存。QCGJ-B01 高效的解磷能力有益于将其用作生物肥料,并且其全基因组数据有助于更好地理解其解磷性状的遗传基础。

关键词:脐橙;根际解磷菌;筛选分离;解磷能力;全基因组测序

中图分类号:S154.3;S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)10-0039-09

磷(P)是植株生长发育必需的养分之一,在植株的干质量中占比约 0.2%^[1]。磷素不仅参与生物大分子的合成(核酸、ATP、酶、磷脂),也对植物的各种生命活动(呼吸作用、光合作用和信号传导)起着积极作用^[2-4]。土壤中的总磷含量约占 0.05%,可供植物吸收的有效磷含量则只占总磷含量的 0.1%^[5],这与磷元素易被固定并且移动性极差有关^[6-7]。土壤中磷素储备的匮乏通常通过施加大量磷肥来弥补,可以保证作物吸收到充足的磷,以营求更高的产量,但是实际上作物对磷肥的利用率仅有 5%~25%^[8-9],这是由于磷肥中的可溶性磷易与土壤中的阳离子(Ca^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Al^{3+} 或 Zn^{2+})结合而沉淀,与土壤固相表面(碳酸钙、氧化铝、氧化铁和硅酸铝)相互作用而被吸附,且易被其他土壤生物吸收转化成有机磷而固定^[10-11],使得磷肥中

70%~90%的可溶性磷都无法被植株吸收利用^[12]。磷肥的大量施用也将导致环境污染问题,如有毒元素(硒、砷)的积累、土壤养分失衡甚至进入地下水引起水体富营养化^[13-15]。为了避免使用磷肥带来的负面影响,寻求一种环境友好、资源节约且可持续为作物供磷的方法意义重大。

解磷菌(phosphate solubilizing bacteria, PSB)可通过酸解、酶解、呼吸作用和 NH_4^+ 同化作用等方式将土壤中的难溶性磷转化成有效磷,并且能防止释放出的有效磷再次转化成难溶性磷^[16-18]。因此,将 PSB 作为化学磷肥的替代品,在可持续农业中有广阔的应用前景。PSB 可以分泌低相对分子量的有机酸(柠檬酸、苹果酸、丁二酸、草酸、葡萄糖酸等),而有机酸在环境基质中自由扩散,通过降低 pH 值和络合金属阳离子,能够把土壤中的不溶性无机磷酸盐转化成植物可利用的游离态磷酸盐离子^[19]。筛选出高效 PSB 并将其作为生物肥料回接入土壤中是促进作物生长和提高作物产量的有效方法^[20]。在过去几十年里,研究者从土壤和植物根际分离了大量 PSB,如假单胞菌属、肠杆菌属、芽孢杆菌属、欧文氏菌属、固氮菌属、根瘤菌属、慢生根瘤菌属、不

收稿日期:2022-07-12

基金项目:国家重点研发计划(编号:2019YFC1805100)。

作者简介:郭小丹(1998—),男,江西赣州人,硕士研究生,主要从事环境微生物研究。E-mail:GXD15779758580@163.com。

通信作者:余水静,博士,副教授,主要从事环境微生物研究。
E-mail:yushuijing2008@163.com。

动杆菌属、黄杆菌属、克雷伯氏菌属和微球菌属等菌株都是土壤中常见的高效 PSB^[8,21-22]。

基因的研究不仅能在更深层次理解生物个体的特殊性,也有助于揭示生物特殊功能的作用机制^[23]。通过对菌株的全基因组测序可以获得菌株的基因组序列,以此来注释其重要的基因和蛋白,进一步了解其功能、作用及调控机制。全基因组测序是目前研究微生物进化和遗传等机制及主要功能基因的关键工具^[24]。众多微生物都有解磷特性,但目前并没有发现特异的解磷基因。关于提升 PSB 解磷能力的研究大多集中于筛选条件的选择和培养条件的优化。本研究基于筛选的高效解磷菌株的全基因组序列,对菌株的磷代谢途径和溶磷有关基因进行分析,明确其功能和作用及调控机制,以期为其解磷性状和遗传背景提供基础。

1 材料与方法

1.1 土样采集

土壤样品于 2021 年 10 月采自江西省赣州市某脐橙果园(地理位置:26°12'30"N,115°11'11"E),将果园划分成 6 个区域,每个区域选取 5 棵优质高产且对应树龄在 10 年以上的脐橙树进行取样。在选定的脐橙树滴水线区域向下挖 20~30 cm 深度采集根际土壤,将采集的土壤样品收纳在灭菌塑料袋中,在 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2 解磷菌的筛选

平板初筛:称取 5 g 过 30 目筛的土样,加入 95 mL 无菌水中,摇床振荡 30 min (30℃, 180 r/min) 制备母液。采用梯度稀释法稀释母液,取连续稀释所得土壤悬浮液(稀释倍数为 10^3 、 10^4 、 10^5) 100 μ L 涂布到以磷酸三钙(TCP)为唯一磷源的无机磷(IP)琼脂培养基[含有 10.00 g/L 葡萄糖、0.50 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.30 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.30 g/L NaCl、0.30 g/L KCl、0.03 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、5.00 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、5.00 g/L 琼脂,pH 值为 7.0~7.5]上^[25]。每个处理设 3 次重复,于 (30 ± 1) ℃ 培养 7 d。出现清晰透明圈的菌落即认为是具有溶解难溶性磷酸盐能力的菌株^[26-27]。将选中的菌株单独以划线法在 IP 琼脂培养基上纯化培养 2~3 代,纯化后的菌落接种在 IP 斜面培养基上,于 4℃ 保存以备进一步的研究使用。

1.3 菌株的溶磷能力分析

1.3.1 菌株解磷能力的定性分析

将菌株点接于 IP 琼脂培养基上,在 (30 ± 1) ℃ 培养 7 d,每个菌株设 3 次重复。随着菌落的生长,其周围逐渐出现的透明区域代表 TCP 发生溶解。溶磷指数(SI) = 透明圈直径(D)/菌落直径(d),用 SI 初步评估不同菌株的解磷能力^[28]。

1.3.2 菌株解磷能力的定量分析

用 LB 液体培养基活化解磷菌株来制备菌悬液($D_{600\text{nm}} = 0.7$),按照 2% 的接种量接入装有 IP 液体培养基(不加琼脂)的锥形瓶中。摇床培养 [(30 ± 1) ℃, 180 r/min] 7 d 后取样,在 6 000 r/min 离心 20 min,取上清液,用钼锑抗比色法测定上清液中的有效磷浓度^[29]。每个处理重复 3 次,并以接种等量无菌水的 IP 液体培养基作为空白对照(CK)。

1.4 菌株 7 d 动态溶磷量和 pH 值的测定

有效磷浓度的测定方法同“1.3.2”节,pH 值用 pH 计测定,每 24 h 测定 1 次,连续测定 7 d。

1.5 全基因组的测序和注释

基于 de novo 测序技术对 QCGJ-B01 基因组进行测序,利用生物信息学手段从头组装得到基因组序列。采用二代+三代即 Illumina Hiseq + PacBio 的测序方式,要求每个样品同时提供不低于基因组 100 倍的 PacBio 测序数据和 100 \times Illumina 测序数据,保证更完整更精确的组装,得到细菌基因组完成图。用 FastQC、Trimmomatic (Version 0.36) 等软件对原始数据进行质控和过滤,用 SOAPdenovo (Version 2.04) 完成基因组的组装,用 Glimmer (Version 3.02)、barrnap (Version 0.9)、tRNAscan-SE (Version 2.0) 等软件对基因组进行预测,用 CGView (Version 2) 软件构建圈图,对解磷菌株 QCGJ-B01 的基因组进行展示。对预测和注释的基因序列进行分析,并根据与 KEGG 途径的比较,通过人工检查分配的基因功能,以确定有机酸合成和磷代谢途径的存在。全基因组测序工作由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

基于菌株的 31 个管家基因(house-keeping genes: *dnaG*、*frr*、*infC*、*nusA*、*pgk*、*pyrG*、*rplA*、*rplB*、*rplC*、*rplD*、*rplE*、*rplF*、*rplK*、*rplL*、*rplM*、*rplN*、*rplP*、*rplS*、*rplT*、*rpmA*、*rpoB*、*rpsB*、*rpsC*、*rpsE*、*rpsI*、*rpsJ*、*rpsK*、*rpsM*、*rpsS*、*smpB*、*tsf*) 序列,基于 Blast+ 软件在上海美吉生物医药科技有限公司的本地数据库中进行比对分析,选择在种属水平上最接近的 19 株菌株,通过 MEGA 6.0 软件选择邻接法(neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树。

1.6 统计分析

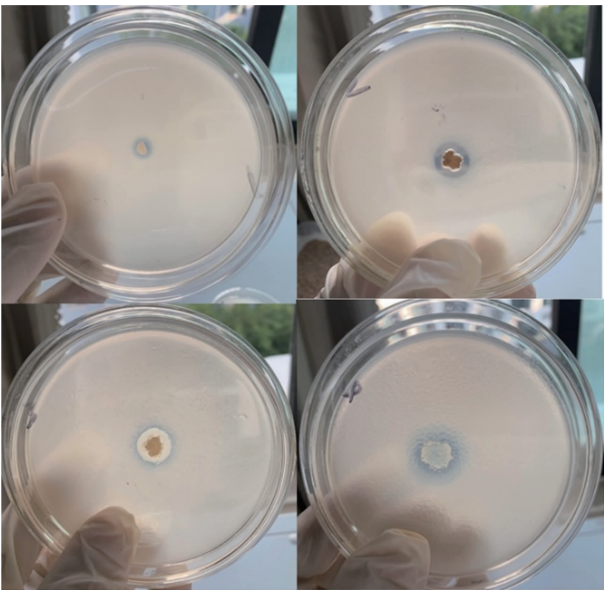
每个处理均设 3 次重复,试验数据用 SPSS 16.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 解磷菌的分离和筛选

将来自脐橙根际的菌株接种到 IP 琼脂培养基上,菌株是否能生长与其能否利用 TCP 形式的无机磷有关。从平板上生长的 66 个菌落中挑取 12 个菌落结构独特的菌株,发现其周围均产生了清晰的透明圈,这是由于菌落周围区域的剧烈酸化导致 TCP 溶解。选择其中 4 个菌落及其透明圈展示在图 1 中。

由表 1 可以看出,12 株 PSB 在菌落的形态特征上均有差异,根据菌落形态特征不同,认为这 12 株菌株属于不同菌种。这些分离株在 IP 琼脂培养基上生长 7 d 后,形成了大小明显不同的透明圈和菌落。由表 2 可以看出,各菌株表现出不同的解磷能力,各菌株的溶磷指数(SI)范围为 1.048 ~2.500,其中 QCGJ - B01 的 SI 最大(2.500),其次是 QCGJ -



左上为 QCGJ-B01, 右上为 QCGJ-B02, 左下为 QCGJ-B03, 右下为 QCGJ-B04

图1 PSB 在 IP 琼脂培养基中生长形成的透明圈

B04(2.043) 和 QCGJ - B02(1.706)。QCGJ - B04 的透明圈直径(2.35 cm)和菌落直径(1.15 cm)都最大。

表 1 12 株 PSB 分离株的形态特征

菌株编号	颜色	菌落形状	质地	高度	边缘
QCGJ - A01	淡黄色	圆形	光滑;黏稠;易挑起	扁平	规整
QCGJ - A02	金黄色	同心圆形	粗糙;粉状;易挑起	扁平	锯齿形
QCGJ - A03	灰白色	卵圆形	多皱;干燥;易挑起	隆起	毛糙
QCGJ - B01	淡黄色	点状	蜡状;湿润;易挑起	扁平	毛糙
QCGJ - B02	黄色	圆形	光滑;硬质;难挑起	隆起	规整
QCGJ - B03	黄色	同心圆形	粗糙;硬质;难挑起	隆起高	规整
QCGJ - B04	乳白色	同心圆形	蜡状;黏稠;易挑起	扁平	规整
QCGJ - B05	黄色	同心圆形	光滑;干燥;易挑起	扁平	规整
QCGJ - B06	乳白色	卵圆形	多皱;干燥;易挑起	隆起	规整
QCGJ - B07	乳白色	圆形	多皱;黏稠;难挑起	火山口状	规整
QCGJ - C01	金黄色	圆形	光滑;湿润;易挑起	扁平	规整
QCGJ - C02	黄色	不规则状	光滑;湿润;易挑起	隆起	毛糙

7 d 解磷量是评价菌株溶磷能力的又一个重要指标。用 IP 液体培养基对 12 株解磷菌的进一步筛选试验结果(图 2)显示,12 株 PSB 的解磷量为 64.11 ~303.14 mg/L,菌株 QCGJ - B01 具有最高的 TCP 溶解能力(解磷量为 303.14 mg/L),其次是 QCGJ - B02(解磷量为 280.84 mg/L)。2 个试验结果均显示,解磷菌株 QCGJ - B01 的解磷能力最强,其次是 QCGJ - B02,而 QCGJ - B04 产生了直径最大的透明圈和菌落,但其 7 d 解磷量却最低

(64.11 mg/L)。因此,将 QCGJ - B01 与 QCGJ - B02、QCGJ - B04 共 3 株 PSB 共同加入下部分试验中。

2.2 3 株 PSB 7 d 的动态解磷量和 pH 值

对菌株 7 d 的动态解磷量和 pH 值的测定有助于进一步了解菌株的解磷能力和明确有效磷浓度与 pH 值之间的相关性,从而初步判断酸化是否是菌株解磷的主要策略。在 7 d 培养过程中,3 株 PSB 培养基中的有效磷浓度和 pH 值的变化见图 3。可

表 2 以 SI 为衡量标准对 12 株 PSB 解磷能力的测定结果

菌株编号	菌落直径 (cm)	透明圈直径 (cm)	SI
QCGJ - B01	0.40	1.00	2.500
QCGJ - B04	1.15	2.35	2.043
QCGJ - B02	0.85	1.45	1.706
QCGJ - B03	1.05	1.50	1.429
QCGJ - C02	0.96	1.12	1.167
QCGJ - B05	0.56	0.65	1.161
QCGJ - C01	0.95	1.10	1.158
QCGJ - A01	0.96	1.03	1.073
QCGJ - A03	0.85	0.91	1.071
QCGJ - B06	0.75	0.79	1.053
QCGJ - A02	1.00	1.05	1.050
QCGJ - B07	1.05	1.10	1.048

以看出,随着菌株解磷量的上升,pH 值也随之下降。菌株 QCGJ - B01 在培养 48 h 达到最大解磷量 (317.48 mg/L) 和最低 pH 值(4.08)。菌株 QCGJ - B02 在培养 96 h 达到最大解磷量(283.50 mg/L) 和

最低 pH 值(4.77)。菌株 QCGJ - B04 在培养 24 h 达到最大解磷量 (280.75 mg/L) 和最低 pH 值 (4.43)。表明菌株通过分泌有机酸降低培养基 pH 值,释放了大量有效磷。3 株菌株在培养前 24 h 解磷量的增速最快,培养 24 h 后 QCGJ - B01、QCGJ - B02 菌株解磷量的增速放缓,达到最大值后有小幅波动。与以上 2 株菌株不同的是,QCGJ - B04 的解磷量在培养 24 h 时达到最大值后便急剧下降,甚至比空白对照 (CK) 的解磷量 (22.4 mg/L) 更低。QCGJ - B04 的 pH 值也在培养 24 h 后急剧上升,最高达 8.25,高于空白对照的 pH 值(7.10)。在空白处理中检测到很少的可溶性磷,pH 值也十分稳定,与初始 pH 值(7.08)相差不大。由图 4 可知,解磷量与 pH 值间存在显著负相关关系($r^2=0.9433$)。

2.3 全基因组序列分析

2.3.1 基因组特征与种内系统发育分析 测序结果显示,菌株 QCGJ - B01 的基因组大小为 8 127 322 bp,G + C 含量为 67.58%,基因组特征的细节展示在图 5 中。预测的 QCGJ - B01 基因总数为 7 425 个,包括 66 个 tRNA 和 4 个 rRNA 编码基

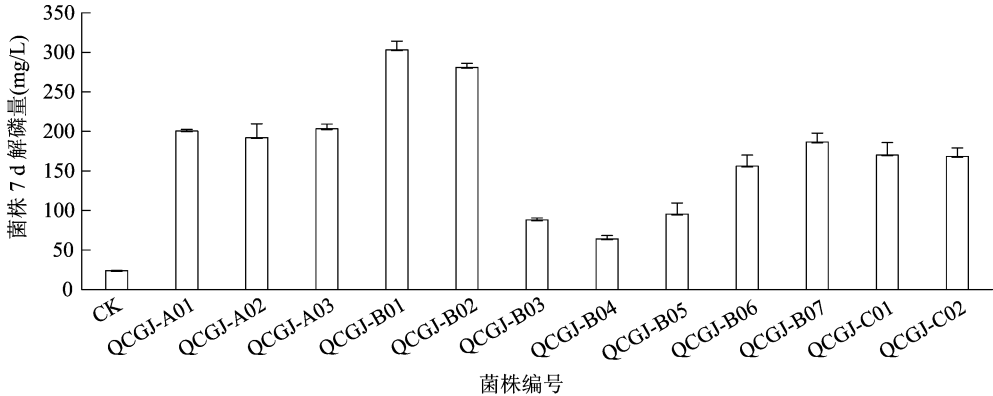


图2 12 株 PSB 7 d 的平均解磷量(n=3)

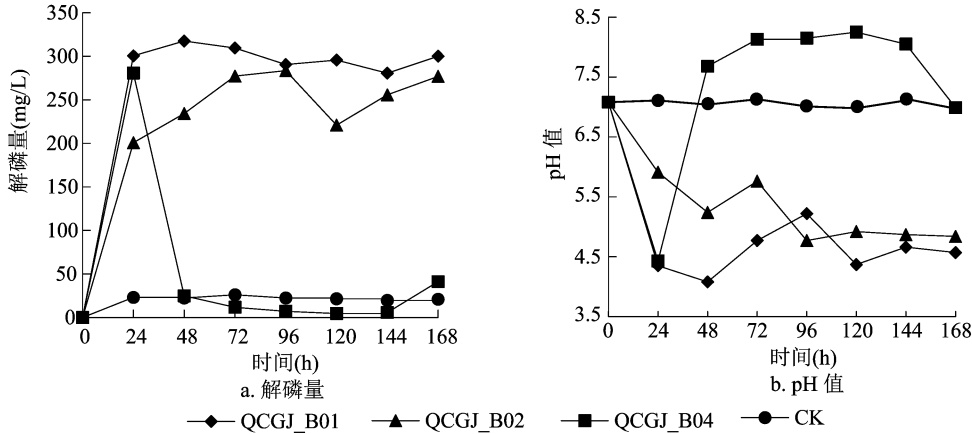


图3 3 株 PSB 菌株在 IP 液体培养基中的解磷能力

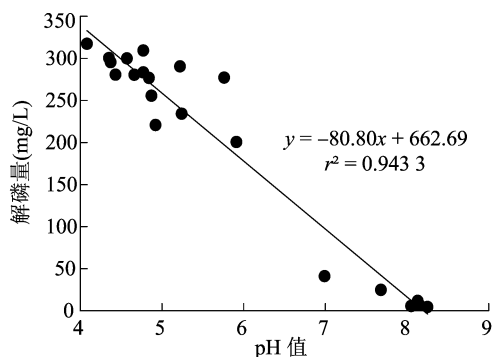
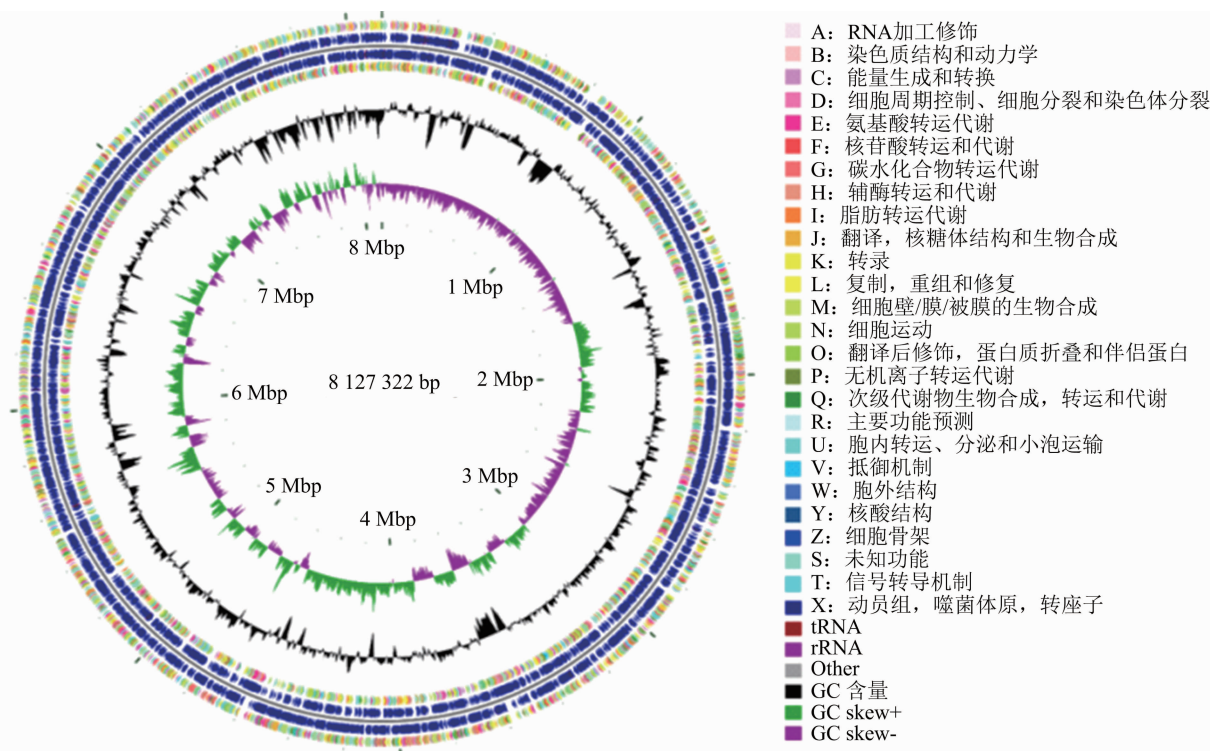


图4 解磷量与 pH 值的相关性

因。16S rRNA 基因序列在同一细菌物种中高度保守,因此它们经常用于识别和分类微生物。为了鉴定 QCGJ-B01,使用 BLASTn 将 16S rRNA 基因在 NCBI 数据库中进行比对,通过比对发现,QCGJ-B01 与洋葱伯克霍尔德菌的相似性高达 99.929%,

QCGJ-B01 与伯克霍尔德菌属其他菌种的相似性匹配度也较高(99.788%~99.929%)。上述分析结果表明,菌株 QCGJ-B01 属于洋葱伯克霍尔德菌群,该菌群有不少于 20 种菌种,包括 *Burkholderia anthina*、新洋葱伯克霍尔德氏菌(*B. cenocepacia*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*B. cepacia*)、污染伯克霍尔德氏菌(*B. contaminans*)、*B. lata*、吡咯伯克霍尔德菌(*B. pyrrocinia*)和稳定伯克霍尔德菌(*B. stabilis*)等。16S rRNA 基因无法清楚地区分洋葱伯克霍尔德菌群中的菌种,而使用管家基因可以更好地辅助细菌物种的分类,并且已经由许多研究证实^[30]。因此,本研究基于管家基因创建了系统发育树,系统发育树通过邻接法获得相关分类群的代表性菌株。由图 6 可以看出,QCGJ-B01 和新洋葱伯克霍尔德菌(*B. cenocepacia*)的亲缘关系最接近,序列相似性达 99.2%。

图5 *Burkholderia cenocepacia* QCGJ-B01 的基因组图

2.3.2 有机酸合成与磷代谢基因分析 QCGJ-B01 有许多与有机酸合成和磷酸盐代谢有关的基因,赋予菌株相关性状的基因见表 3。葡萄糖酸(GA)被认为是大多数细菌中负责溶解无机磷酸盐的主要有机酸之^[31]。GA 可由醌蛋白葡萄糖脱氢

酶(GDH)及其辅因子吡咯喹啉醌合成蛋白(PQQ)共同作用而合成。QCGJ-B01 是一株高效解磷菌株,基因组分析结果表明,QCGJ-B01 具有编码 GDH 的基因,并携带氧化还原辅因子 *pqq* 基因,包括 *pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE* 基因,缺乏 *pqqA* 基因。

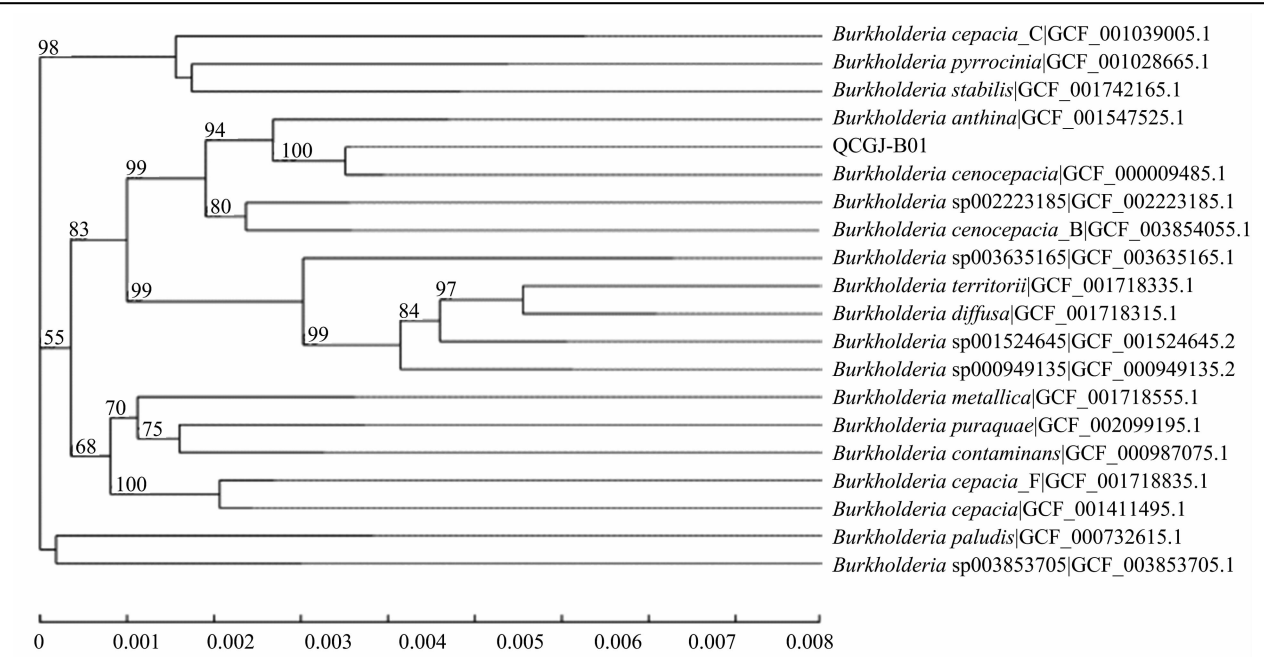


图6 基于管家基因构建的系统进化树

表 3 *Burkholderia cenocepacia* QCGJ – B01 的有机酸合成酶与磷代谢基因

基因 ID	KO 数据库 ID	基因名称	KEGG 注释功能描述
gene6153	K19813	<i>gdh</i>	葡萄糖脱氢酶
gene1490	K06139	<i>pqqE</i>	PqqA 多肽环化酶
gene1491	K06138	<i>pqqD</i>	吡咯喹啉醌生物合成蛋白 D
gene1492	K06137	<i>pqqC</i>	吡咯喹啉 – 苯醌合成酶
gene1493	K06136	<i>pqqB</i>	吡咯喹啉醌生物合成蛋白 B
gene2149	K01647	<i>gluA</i>	柠檬酸合成酶
gene6688	K19670	<i>phnA</i>	磷酸乙酸水解酶
gene2332	K04750	<i>phnB</i>	PhnB 蛋白
gene5819	K03430	<i>phnW</i>	2 – 氨基乙基磷 – 丙酮酸转氨酶
gene2411	K02036	<i>pstB</i>	磷酸转运系统 ATP 结合蛋白
gene2412	K02038	<i>pstA</i>	磷酸盐转运系统渗透酶蛋白
gene2413	K02037	<i>pstC</i>	磷酸盐转运系统渗透酶蛋白
gene2414	K02040	<i>pstS</i>	磷酸盐转运系统底物结合蛋白
gene2408	K07636	<i>phoR</i>	双组分系统, OmpR 家族, 磷酸调节蛋白感受器组氨酸蛋白激酶
gene2409	K07657	<i>phoB</i>	双组分系统, OmpR 家族, 磷酸调节蛋白反应调节剂 PhoB
gene2410	K02039	<i>phoU</i>	磷酸盐转运系统蛋白

pqqA 是一种由 24 个氨基酸组成的短肽,是转化为 PQQ 的前体^[32]。但 Toyama 等的研究发现,在甲基杆菌 PQQ 的生物合成过程中,由 *pqqA* 编码的酶是非必需的^[33]。此外研究者还发现 QCGJ – B01 具有柠檬酸合成酶基因(*gluA*)。许多研究结果表明,磷酸酯的矿化是土壤有效磷的又一个主要来源,它是一种有机磷化合物,包含 1 个碳—磷(C—P)键,而不是众所周知的磷酸酯键(C—O—P)^[34]。*phn* 基

因簇指导合成的碳—磷键裂解酶可使菌株将磷酸酯水解成磷酸盐和烷烃。QCGJ – B01 具有 *phnA*、*phnB*、*phnW* 基因,其中 *phnA* 是磷酰乙酸降解所必需的,但是它缺失了大部分合成碳—磷键裂解酶复合物所需的基因,包括 *phnE* ~ *phnO*,表明 QCGJ – B01 可能缺乏矿化磷酸酯的能力。

细菌对一般是通过质膜上特定的磷化合物转运蛋白完成对磷的吸收,包含通过 *pstS*、*pstC*、*pstA*、

pstB 编码基因合成的无机磷酸盐特异性转运蛋白和通过 *phnE*、*phnD*、*phnC* 编码基因合成的磷酸酯转运蛋白。QCGJ - B01 具有 *pstS*、*pstC*、*pstA*、*pstB* 基因但未携带 *phnE*、*phnD*、*phnC* 基因, *pstS*、*pstC*、*pstA*、*pstB* 编码基因的激活受到磷缺乏响应调控系统的控制。QCGJ - B01 的磷缺乏响应调控系统由双组分调节系统 *phoR* (磷酸盐调节感应激酶) - *phoB* (磷酸盐调节反反应调控子) 控制^[35]。*phoR* 通过磷酸化转录因子 *phoB* 来响应磷酸盐的缺乏, 然后 *phoB* 与称为 *phoBOX* 的 DNA 序列结合, 以激活或抑制基因的转录。除此之外, 还发现 QCGJ - B01 具有 *phoU* 基因, *phoU* 是一种金属结合蛋白, 是在磷充足时进行 *phoB* 的去磷酸化所必需的, 以避免不受控制的磷酸盐摄取^[35]。

3 讨论

本研究以脐橙根际土壤为材料分离解磷菌, 这是因为与非根际土壤相比, 根际土壤中的 PSB 种群数量要高得多^[36]。本研究分离出了 12 株菌落周围能产生透明圈的菌株。根据溶磷指数 ($SI > 1.5$) 和解磷能力 (7 d 溶磷量 > 250 mg/L) 指标, 筛选出了 3 株最佳菌株 (QCGJ - B01、QCGJ - B02、QCGJ - B04), 其中菌株 QCGJ - B01 的溶磷指数最大 ($SI = 2.500$) 且解磷量最高 (317.48 mg/L)。进一步对 3 株菌株在 7 d 中的动态解磷量和 pH 值变化进行监测, 发现 QCGJ - B01、QCGJ - B02 的 pH 值分别在 48、96 h 降到最小值, 解磷量达到最大值, 随后在一个范围内波动, 总体呈下降的趋势。这是由于菌株在适宜的 pH 值范围内才会展现出最佳的解磷活性, 而偏酸性的环境不适合菌株的生长, 所以当 pH 值下降到一定程度时, 解磷过程将会受到限制, 这与 Qian 等的试验结果^[37]一致。QCGJ - B04 与 QCGJ - B01、QCGJ - B02 的表现不同, 在 24 h 达到最大解磷量和最小 pH 值后, 解磷量急剧下降, pH 值急剧上升, 随后一直处于低溶磷量、高 pH 值的状态。Pérez 等也发现了类似的情况, 这是因为菌株生长迅速, 在培养基中达到了高细胞密度, 因此需要消耗大量磷来维持菌株的生长^[38]。而且 QCGJ - B04 在 IP 琼脂培养基上表现出了比其他菌株更大的菌落。上述结果都证明 QCGJ - B04 生长迅速, 消耗了大量有效磷。菌株在细菌生长过程中, pH 值的下降伴随着培养基中可溶性磷含量的上升, pH 值的 (4.08) 最低值与最高的溶磷量

(317.48 mg/L) 同时出现。可溶性磷含量与 pH 值呈负相关 ($r^2 = 0.9433$)。这与 Chen 等的研究结果^[39-40]一致。pH 值的下降可能是由于有机酸的产生, 表明酸化是该菌株溶解难溶性磷酸盐的主要策略^[41-42]。

有研究发现, 土壤中的 PSB 数量十分可观, 无论是好氧菌株还是厌氧菌株均有被发现, 如假单胞菌属、芽孢杆菌属、根瘤菌属、伯克霍尔德菌属、无色杆菌属、农杆菌属、微球菌属等, 并且新的 PSB 菌株也在不断涌现。本研究对解磷能力最强的菌株 QCGJ - B01 进行了全基因组测序, 通过菌种鉴定, 确定 QCGJ - B01 为新洋葱伯克霍尔德菌株 (*B. cenocepacia*)。*B. cenocepacia* 是一种高 GC 含量的革兰氏阴性菌, 因其具有多条染色体、基因组岛和大量插入序列, 使其基因组具有高可塑性^[43-44]。伯克霍尔德氏菌属在许多研究中被发现具有溶解难溶性磷酸盐的能力, 但良好的磷酸盐溶解能力不是新洋葱伯克霍尔德菌的普遍性状^[45-50]。葡萄糖酸是革兰氏阴性菌中发现最多的关于溶解难溶性磷酸盐的基因, 研究发现 *B. cenocepacia* QCGJ - B01 具有编码 *gdh* 的基因, 并携带氧化还原辅因子 *pqq* 基因^[51-52]。You 等分离出的 *B. cenocepacia* CR318 中的醌蛋白葡萄糖脱氢酶编码基因缺失并表现出更低的溶磷指数 ($SI = 2.00$)^[50], 表明负责葡萄糖酸合成的基因可能是提升新洋葱伯克霍尔德菌解磷能力的关键因素之一。此外, 还有研究发现 QCGJ - B01 具有柠檬酸合成酶基因 (*glcA*), 增强了菌株分泌有机酸的能力, 从而增加了难溶性磷酸盐的可用性。QCGJ - B01 还携带 *pstS*、*pstC*、*pstA*、*pstB*、*phoR* - *phoB*、*phoU* 基因, QCGJ - B01 通过基因组 *pstS*、*pstC*、*pstA*、*pstB* 负责的磷酸盐转运系统部分吸收无机磷酸盐。*B. cenocepacia* QCGJ - B01 缺乏矿化磷酸酯的基因 (*phnE* ~ *phnO*) 和编码磷酸酯转运蛋白的基因 (*phnE*、*phnD*、*phnC*), 可能使其无法利用额外的有机磷源, 不利于其在不存在有效磷的环境中生存。目前, 关于具有溶解磷酸盐能力的新洋葱伯克霍尔德菌的全基因组测序鲜有报道, 本研究数据可能有助于更好地理解这一性状的遗传基础。

4 结论

经过筛选分离, 本研究得到 3 株解磷能力尤其突出的菌株 QCGJ - B01、QCGJ - B02、QCGJ - B04, 它们在释放大量有效磷的同时也降低了溶液 pH

值,初步确定酸化是其主要溶磷机制。此外,本研究得到了 QCGJ-B01 全基因组序列,其基因组大小为 8 127 322 bp, G + C 含量为 67.58%, 预测到 7 425 个基因,包括 66 个 tRNA 和 4 个 rRNA 编码基因。基于管家基因鉴定 QCGJ-B01 为新洋葱伯克霍尔德菌。并且在全基因组水平揭示了 *B. cenocepacia* QCGJ-B01 具有无机磷增溶基因(*gdh*、*pqqB*、*pqqC*、*pqqD*、*pqqE*、*gltA*)和磷酸盐转运系统基因(*pstS*、*pstC*、*pstA*、*pstB*、*phoR* - *phoB*、*phoU*)。此外,发现 QCGJ-B01 缺乏矿化磷酸酯的基因和编码磷酸酯转运蛋白的基因,可能使其无法利用额外的有机磷源,不利于其在不存在有效磷的环境中生存。研究呈现了 QCGJ-B01 全基因组数据,特别是关于菌株的解磷基因,这将有助于进一步了解 QCGJ-B01 和其他类似生物关于解磷与磷代谢的复杂生物学机制,并可能进一步深入了解该菌株作为生物肥料在农业领域的实际应用。

参考文献:

- [1] Azziz G, Bajsa N, Haghjou T, et al. Abundance, diversity and prospecting of culturable phosphate solubilizing bacteria on soils under crop - pasture rotations in a no - tillage regime in Uruguay [J]. *Applied Soil Ecology*, 2012, 61: 320 - 326.
- [2] Cozzolino V, Meo V D, Piccolo A. Impact of arbuscular mycorrhizal fungi applications on maize production and soil phosphorus availability[J]. *Journal of Geochemical Exploration*, 2013, 129: 40 - 44.
- [3] 池景良,郝敏,王志学,等. 解磷微生物研究及应用进展[J]. *微生物学杂志*, 2021, 41(1): 1 - 7.
- [4] Khan M S, Zaidi A, Ahemad M, et al. Plant growth promotion by phosphate solubilizing fungi - current perspective[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2010, 56(1): 73 - 98.
- [5] Zou X M, Binkley D, Dostader K G. A new method for estimating gross phosphorus mineralization and immobilization rates in soils[J]. *Plant & Soil*, 1992, 147(2): 243 - 250.
- [6] 张艺灿,刘凤之,王海波. 根际溶磷微生物促生机制研究进展[J]. *中国土壤与肥料*, 2020(2): 1 - 9.
- [7] Takahashi S, Anwar M R. Wheat grain yield, phosphorus uptake and soil phosphorus fraction after 23 years of annual fertilizer application to an Andosol[J]. *Field Crops Research*, 2007, 101(2): 160 - 171.
- [8] da Costa E M, de Lima W, Oliveira - Longatti S M, et al. Phosphate - solubilising bacteria enhance *Oryza sativa* growth and nutrient accumulation in an oxisol fertilized with rock phosphate [J]. *Ecological Engineering*, 2015, 83: 380 - 385.
- [9] Roberts T L, Johnston A E. Phosphorus use efficiency and management in agriculture [J]. *Resources Conservation and Recycling*, 2015, 105(B): 275 - 281.
- [10] Chang C H, Yang S S. Thermo - tolerant phosphate - solubilizing microbes for multi - functional biofertilizer preparation [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(4): 1648 - 1658.
- [11] 苏奇倩,徐其静,丁豪杰,等. 微生物解磷特性及其铅污染土壤修复应用[J]. *环境科学与技术*, 2020, 43(12): 177 - 184.
- [12] Meena V S, Meena S K, Verma J P, et al. Plant beneficial rhizospheric microorganism (PBRM) strategies to improve nutrients use efficiency: a review[J]. *Ecological Engineering*, 2017, 107: 8 - 32.
- [13] Alori E T, Glick B R, Babalola O O. Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 971.
- [14] 秦利均,杨永柱,杨星勇. 土壤溶磷微生物溶磷、解磷机制研究进展[J]. *生命科学研究*, 2019, 23(1): 59 - 64, 86.
- [15] Henry H, Naujokas M F, Attanayake C, et al. Bioavailability - based in situ remediation to meet future lead (Pb) standards in urban soils and gardens [J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(15): 8948 - 8958.
- [16] 范丙全,刘巧玲. 保护性耕作与秸秆还田对土壤微生物及其溶磷特性的影响[J]. *中国生态农业报*, 2005, 13(3): 130 - 132.
- [17] Richardson A E, Barea J M, McNeill A M, et al. Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms[J]. *Plant & Soil*, 2009, 321(1/2): 305 - 339.
- [18] Richardson A E, Simpson R J. Soil microorganisms mediating phosphorus availability update on microbial phosphorus [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(3): 989 - 996.
- [19] Dixit S, Kuttan K K A, Shrivastava R. Isolation and characterization of phosphorus solubilizing bacteria from manganese mining area of Balaghat and Chhindwara [J]. *Current Science*, 2017, 113(3): 500 - 504.
- [20] Kaur G, Reddy M S. Effects of phosphate - solubilizing bacteria, rock phosphate and chemical fertilizers on maize - wheat cropping cycle and economics[J]. *Pedosphere*, 2015, 25(3): 428 - 437.
- [21] Paul D, Sinha S N. Bacteria showing phosphate solubilizing efficiency in river sediment[J]. *Electronic Journal of Biosciences*, 2013, 1(1): 1 - 5.
- [22] Pereira S I A, Castro P M L. Phosphate - solubilizing rhizobacteria enhance *Zea mays* growth in agricultural P - deficient soils [J]. *Ecological Engineering*, 2014, 73: 526 - 535.
- [23] 周亮亮. 柑橘溃疡病生防菌 *Bacillus velezensis* QC - J 全基因组测序及比较基因组学分析[D]. 赣州:江西理工大学, 2021: 7 - 10.
- [24] 马锦锦. 枸杞根际促生细菌筛选、培养基优化及基因组测序 [D]. 泰安:山东农业大学, 2017: 17 - 23.
- [25] Liu F P, Liu H Q, Zhou H L, et al. Isolation and characterization of phosphate - solubilizing bacteria from betel nut (*Areca catechu*) and their effects on plant growth and phosphorus mobilization in tropical soils[J]. *Biology & Fertility of Soils*, 2014, 50(6): 927 - 937.
- [26] 乔策策,王甜甜,王若斐,等. 高效溶磷菌的筛选及其促生效应研究[J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40(4): 664 - 670.
- [27] Zaidi A, Khan M S, Ahemad M, et al. Plant growth promotion by

- phosphate solubilizing bacteria [J]. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica, 2009, 56(3): 263–284.
- [28] Liu Z, Li Y C, Zhang S, et al. Characterization of phosphate – solubilizing bacteria isolated from calcareous soils[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 96: 217–224.
- [29] 黄 静, 盛下放, 何琳燕. 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性[J]. 微生物学报, 2010, 50(6): 710–716.
- [30] Iyer B, Rajkumar S. Genome sequence and comparative genomics of *Rhizobium* sp. Td3, a novel plant growth promoting phosphate solubilizing *Cajanus cajan* symbiont[J]. Microbiological Research, 2018, 218: 32–40.
- [31] Liu W X, Wang Q L, Hou J Y, et al. Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth – promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 26710.
- [32] Misra H S, Rajpurohit Y S, Khaimar N P. Pyrroloquinoline – quinone and its versatile roles in biological processes[J]. Journal of Biosciences, 2012, 37(2): 313–325.
- [33] Toyama H, Lidstrom M E. pqqA is not required for biosynthesis of pyrroloquinoline quinone in *Methylobacterium extorquens* AM1[J]. Microbiology, 1998, 144(1): 183–191.
- [34] Shariati J V, Malboobi M A, Tabrizi Z, et al. Comprehensive genomic analysis of a plant growth – promoting rhizobacterium *Pantoea agglomerans* strain P5 [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1–12.
- [35] Santos – Benoit F. The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 402.
- [36] Panhwar Q A, Othman R, Abdul R Z, et al. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacteria from aerobic rice [J]. Afr J Biotechnol, 2012, 11(11): 2711–2719.
- [37] Qian Y C, Shi J Y, Chen Y X, et al. Characterization of phosphate solubilizing bacteria in sediments from a shallow eutrophic lake and a wetland: isolation, molecular identification and phosphorus release ability determination[J]. Molecules, 2010, 15(11): 8518–8533.
- [38] Pérez E, Sulbarán M, Ball M M, et al. Isolation and characterization of mineral phosphate – solubilizing bacteria naturally colonizing a limonitic crust in the south – eastern Venezuelan region[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(11): 2905–2914.
- [39] Chen Y P, Rekha P D, Arun A B, et al. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities[J]. Applied Soil Ecology, 2006, 34(1): 33–41.
- [40] Xiang W L, Liang H Z, Liu S, et al. Isolation and performance evaluation of halotolerant phosphate solubilizing bacteria from the rhizospheric soils of historic Dagong Brine Well in China[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2011, 27(11): 2629–2637.
- [41] Sharma S B, Sayyed R Z, Trivedi M H, et al. Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils[J]. SpringerPlus, 2013, 2(1): 587.
- [42] 管 冠, 郭等等, 李倩磊, 等. 生草栽培对纽荷兰脐橙根系生长土壤微生物群落的影响[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(17): 220–225.
- [43] Zekic F, Weselowski B, Yuan Z C. Complete genome sequence of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate – solubilizing bacterium isolated from corn root [J]. Genome Announcements, 2017, 5(23): e00490–17.
- [44] Mannaa M, Park I, Seo Y S. Genomic features and insights into the taxonomy, virulence, and benevolence of plant – associated *Burkholderia* species [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 20(1): 121.
- [45] Peix A, Mateos P F, Rodriguez – Barrueco C, et al. Growth promotion of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by a strain of *Burkholderia cepacia* under growth chamber conditions [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2001, 33(14): 1927–1935.
- [46] Collavino M M, Sansberro P A, Mroginski L A, et al. Comparison of *in vitro* solubilization activity of diverse phosphate – solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth [J]. Biology and Fertility of Soils, 2010, 46(7): 727–738.
- [47] Kothamasi D, Kothamasi S, Bhattacharyya A, et al. Arbuscular mycorrhizae and phosphate solubilizing bacteria of the rhizosphere of the mangrove ecosystem of Great Nicobar island, India [J]. Biology and Fertility of Soils, 2006, 42(4): 358–361.
- [48] Kumar V, Behl R K, Narula N. Establishment of phosphate – solubilizing strains of *Azotobacter chroococcum* in the rhizosphere and their effect on wheat cultivars under green house conditions [J]. Microbiological Research, 2001, 156(1): 87–93.
- [49] Lin T F, Huang H I, Shen F T, et al. The protons of gluconic acid are the major factor responsible for the dissolution of tricalcium phosphate by *Burkholderia cepacia* CC – A174 [J]. Bioresource Technology, 2006, 97(7): 957–960.
- [50] You M, Fang S M, MacDonald J, et al. Isolation and characterization of *Burkholderia cenocepacia* CR318, a phosphate solubilizing bacterium promoting corn growth [J]. Microbiological Research, 2019, 233: 126395.
- [51] Behera B C, Singdevsachan S K, Mishra R R, et al. Diversity, mechanism and biotechnology of phosphate solubilising microorganism in mangrove: a review [J]. Biocatalysis & Agricultural Biotechnology, 2014, 3(2): 97–100.
- [52] Goldstein A H. Involvement of the quinoprotein glucose dehydrogenase in the solubilization of exogenous phosphates by gram – negative bacteria [M]//Torriani – Gorini A, Yagil E, Silver S. Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. Washington DC: ASM Press, 1994: 197–203.