

文章编号:1001-1498(2015)02-0166-07

油茶根际高效溶磷细菌的筛选、鉴定及其安全性测试

王舒, 张林平*, 郝菲菲, 张扬, 胡冬南

(江西农业大学园林与艺术学院,江西 南昌 330045)

摘要:本研究利用溶磷圈法和钼锑抗比色法,从油茶根际分离出20株高效溶无机磷细菌,并对其溶磷能力进行定性和定量测试,结果发现,D/d与溶磷细菌的有效磷含量之间没有显著的相关性,而培养液pH与有效磷含量之间存在极显著的负相关性关系($P < 0.01$)。并采用形态特征、生理生化、Biolog系统和16SrDNA序列分析对一株溶磷效果最好的菌株NC285进行菌株鉴定,确定其为*Bacillus aryabhatai*。通过苜蓿植物模型和*cblA*毒力基因测定对该菌株进行安全性检测,结果发现,该菌株未检测到*cblA*基因,对洋葱和苜蓿安全无致病性。本研究对溶磷细菌的安全应用及提高油茶土壤磷素利用效率具有重要意义。

关键词:油茶;溶磷细菌;溶磷能力;安全性测试

中图分类号:S794.4

文献标识码:A

Screening, Identification and Security Test of *Camellia oleifera* Rhizosphere Phosphate-Solubilizing Bacteria

WANG Shu, ZHANG Lin-ping, HAO Fei-fei, ZHANG Yang, HU Dong-nan

(College of Landscape and Art, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, Jiangxi, China)

Abstract: Twenty strains of inorganic phosphate-solubilizing bacteria were isolated from *Camellia oleifera* rhizosphere using phosphate-solubilizing circle and the molybdenum-anti-spectrophotometric method. The phosphate-solubilizing capacity was investigated from 20 strains based on qualitative and quantitative test. The results showed that there was a significant negative correlation between the phosphate solubilizing capacity and the pH medium ($P < 0.01$), whereas there was no such phosphate solubilizing capacity on D/d. The strain NC285 was identified by its morphological, physiological and biochemical characteristics, Biolog system and 16SrDNA gene sequence analysis. The high effective phosphate-solubilizing bacterium of NC285 was identified as *Bacillus aryabhatai*. The virulence of NC285 was tested on *Allium cepa* and *Medicago sativa* seedlings, and the *cblA* virulence genes. No *cblA* gene was detected on NC285 in the test, so this strain is safe for *A. cepa* and *M. sativa*.

Key word: *Camellia oleifera*; phosphate-solubilizing bacteria; phosphate-solubilizing capability; security test

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)是我国南方特有的重要木本食用油料,被称为是“东方橄榄油”,与油橄榄、油棕、椰子并称世界四大木本油料植物^[1-3]。磷是促进植物生长和提高农作物产量不可

缺少的元素^[4],主要来源于土壤,而磷素在土壤中通常以难溶物的形式存在,导致土壤中有效磷含量不足5%,很难满足植物生长^[5]。为提高油茶产量,对其合理施磷肥是增产的关键措施^[6-7],而施入的磷

收稿日期:2014-07-30

基金项目:国家自然科学基金项目(31260194)、江西农业大学博士启动经费(09004155)

作者简介:王舒(1989—),女,甘肃张掖人,在读硕士生,主要从事植物有益微生物研究

* 通讯作者:博士,主要从事大型真菌多样性和森林病理学研究,E-mail:zlping619@163.com

肥在当季仅有 5%~10% 被植物吸收利用,绝大部分磷迅速以 Al-P、Ca-P、Fe-P 的形式转化为难溶性磷酸盐,或被雨水冲洗随水土流失至水体,造成水体污染^[8-11]。

大量研究表明,植物根际土壤存在大量溶磷菌,能够通过自身代谢,将土壤中植物难以吸收的难溶性磷转化为可吸收利用的形态,增加植物对磷素的吸收,进而提高作物产量^[12-13]。不同种类的溶磷菌,其溶磷能力也存在着巨大的差异,而且溶磷机理也不尽相同。有些溶磷菌的溶磷作用主要是因为分泌大量有机酸,降低了培养液 pH,进而把难溶性磷酸盐中的磷酸根溶解出来^[14-15],而培养液 pH 与溶磷菌溶磷能力之间是否存在相关性,研究结果不一。随着微生物肥料新品种的不断扩大,筛选的菌种也越来越多,其安全性已成为人们研究功能菌的热点。李煜^[16]、李晶^[17]在对芽孢杆菌属进行安全性评价时,以小白鼠为试验对象。这种利用动物模型检测菌株安全性的方法精确可靠,但其存在试验周期长、耗资高、操作复杂等缺点。而 Silo-Suh 等利用苜蓿和老鼠对人体条件致病菌进行了毒力试验,观察得到,在老鼠身上产生的毒力作用可同样在苜蓿上表现出相关的毒力结果^[18]。目前,有关油茶根际溶磷细菌的相关系统鲜有报道。因此,本研究在对油茶根际溶磷细菌筛选、鉴定的基础上,采用苜蓿模型简单快捷的对菌株 NC285(芽孢杆菌)进行安全性检测,为油茶高效生物肥料研究提供优良菌种资源和安全性理论依据,对促进油茶产业可持续发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 培养基

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母浸粉 5 g, NaCl 10 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.4。

LB 固体培养基:在液体 LB 培养基中加琼脂 16 g。

溶无机磷细菌筛选培养基(NBRIP)^[19]:葡萄糖 10 g, Ca₃(PO₄)₂ 5 g, MgCl₂ 5 g, KCl 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

溶磷能力测定培养基(NBRI-BPB)^[19]:配方同 NBRIP(添加 0.025 g·L⁻¹的溴酚蓝)。

1%水琼脂培养基:琼脂粉 10 g,蒸馏水 1 000 mL,自然 pH。

1.2 供试植物材料及菌株:

新鲜健康洋葱(*Allium cepa*):购自江西农大菜市场;

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)种子:购自北京禾木青科技有限责任公司;

标准菌株 LMG1222:由南京林业大学森林资源与环境学院叶建仁教授赠送。

1.3 溶磷细菌的分离

采用三点取样法从江西省林业科学院和赣州市南康区唐江镇油茶基地采集 10~15 cm 土层油茶根际土壤,用平板梯度稀释培养法制作成系列悬浮液,取 0.1 mL 涂布于 NBRIP 平板上,28℃,培养 3 d,挑取透明圈明显的细菌,纯化至少 3 次,确定其为纯培养物后,挑取单菌落转接到 LB 斜面培养 2~3 d,并置于 4℃ 冰箱保存。

1.4 溶磷能力测定

1.4.1 定性测定 采用溶磷圈法和 Mehta 和 Nautiyal^[20]的方法(稍作修改)对溶磷菌的溶磷能力进行定性测试。将分离获得的纯菌株分别点接种于 NBRIP 培养基上,置于 28℃ 培养箱中培养 5 d 时观察,观察有无溶磷圈,并根据溶磷圈直径(D)与菌落直径(d)的比值(D/d)初步确定菌株溶磷能力。再将 D/d 值较大的菌落接种到装有 20 mL NBRI-BPB 培养液的 50 mL 三角瓶中,28℃,180 r·min⁻¹培养 3 d,将发酵液离心 10 min(4℃,10 000 r·min⁻¹)。600 nm 下测定上清液的吸光度,并进行溶磷能力分级^[21]。分级标准为:OD₆₀₀ ≤ -1:溶磷能力强(++);-1 < OD₆₀₀ ≤ -0.5:较强(++);-0.5 < OD₆₀₀ ≤ -0.1:弱(+)。同时以未接种作为对照,每处理重复 3 次。

1.4.2 定量测定 利用钼锑抗比色法对溶磷菌的溶磷能力进行定量测试。选取 OD₆₀₀ 负值大的菌株活化后分别接种于 LB 液体培养基中,28℃,180 r·min⁻¹培养 18~24 h,制成种子液,并按 1% 的接种量接种于含 20 mL NBRI-BPB 培养液的 50 mL 三角瓶中,28℃,180 r·min⁻¹振荡培养 3 d,将发酵液离心 10 min(4℃,10 000 r·min⁻¹),采用钼锑抗比色法测定上清液中可溶性磷的含量^[22],并按以下计算溶磷率^[23]。同时以未接种作为对照,每个处理 3 个重复。

溶磷率 = (发酵液有效磷含量 - 对照溶液磷含量) × 溶液体积 / 磷酸三钙中含磷总量 × 100%

1.5 菌株 NC285 鉴定

1.5.1 生理生化特征 参考《伯杰系统鉴定手

册》^[24]中推荐的部分培养基和方法。

1.5.2 系统发育树分析 参照文献^[25]方法提取细菌的基因组 DNA, 采用细菌通用引物 (27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492R: 5'-TACG-GCTACCTTGTACGACTT-3') 对基因组 DNA 进行 16SrDNA 片段扩增; 30 μL PCR 反应体系: mix 15 μL 、引物各 2 μL 、模板 2 μL 、ddH₂O 补足 30 μL ; PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 送上海生工测序。所得序列与 GenBank 数据库中序列进行 BLAST 比对分析, 以相似性达 98% 以上的标准选择参考菌株, 采用 MEGA5.0 软件, 用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树 (Bootstrap = 1000), 分析菌株的系统发育学特征。同时向 GenBank 提交序列并获得登陆号。

1.6 NC285 在苜蓿模型上的安全性测试

1.6.1 供试菌株的准备 活化高效溶磷细菌 NC285 和标准菌株 LMG1222, 28 $^{\circ}\text{C}$, 180 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 培养 24 h。将得到的发酵液离心 10 min (10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$), 弃上清, 加入无菌水混匀, 并重复 3~5 次, 目的是将细菌代谢产物去除, 得到纯菌悬液, 调节菌体浓度在 $1 \times 10^8 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 用于接种苜蓿。

1.6.2 对洋葱致病性的测定 挑取新鲜健康大小一致的洋葱放入装满自来水的瓶口, 让洋葱根系接触水面, 3~4 d 换一次水, 培养 15 d 左右, 待洋葱长出叶子, 剥掉外层老化的表皮, 参照文献^[26]的方法进行洋葱接种, 无菌注射器分别取准备好的高效溶磷细菌 NC285、标准菌株 LMG1222 纯菌悬液和无菌水在洋葱鳞茎上两点对称注射 (深度为 1~2 cm), 以标准菌株 LMG1222 作为阳性对照, 无菌水作为阴性对照。每点注射量 1 mL, 每处理 3 个重复, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 室温培养, 5 d 后观察结果。

1.6.3 对苜蓿幼苗生长的影响 参照张立新^[27]的方法进行接种, 将苜蓿种子用 98% 的浓硫酸浸泡 30 min (约 10 mL 浸 300 颗种子), 无菌水清洗 5~6 次后将种子放于 60 mL 无菌水中, 30 $^{\circ}\text{C}$, 150 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 浸种 8 h, 清洗 3 次, 同等条件下震荡培养过夜。次日, 用无菌水清洗 3 次, 无菌操作将均匀一致的发芽苜蓿种子摆放到 1% 的水琼脂平板上, 每皿摆放 10 颗种子。30 $^{\circ}\text{C}$, 90% 相对湿度, 光照黑暗交替 (光照、黑暗各 12 h) 培养 48~72 h, 直至子叶展开。

取 20 μL 准备好的 NC285、LMG1222 菌悬液和无菌水点在苜蓿幼苗上, 其中致病菌株作为阳性对

照, 无菌水作为阴性对照。每个处理 5 个重复, 每重复 10 颗种子。接种后的种子放在 30 $^{\circ}\text{C}$ 、90% 相对湿度、定时光照 (光照、黑暗各 12 h) 条件的人工气候培养箱, 7 d 后观察苜蓿发病情况。

1.7 *cblA* 毒力基因检测

cblA 基因的检测采用 PCR 特异性扩增技术进行。特异性引物为 *cblA1* (5'-CCAAAGGACTAAC-CCA-3') 和 *cblA2* (5'-ACGCGATGTCCATCACA-3'), 30 μL PCR 反应体系: Mix 15 μL 、引物各 2 μL 、模板 2 μL 、ddH₂O 补足 30 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.8 数据分析

采用 SPSS V13.0 软件对试验数据进行统计分析, 并采用 Excel 2010 软件作图。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离、筛选

从江西省林业科学院茶园和赣州市南康区唐江镇油茶基地油茶根际分离得到能产生溶磷圈的溶无机磷细菌 330 株 (图 1)。利用溶磷圈法对 330 株溶无机磷细菌进行定性和半定量溶磷能力的测定, 结果表明各溶磷细菌所产生的溶磷圈外径与菌落生长的直径比值 (D/d) 都大于 3.30 (表 1), 其中 GZ092 比值最大 (5.92), 次之为 NC285 (5.88)、GZ068 (5.79)。

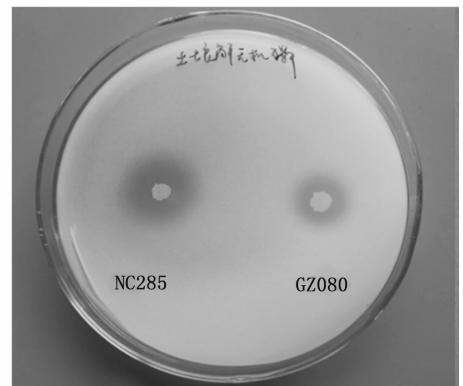


图1 溶磷细菌菌株在 NBRIP 平板上形成的溶磷圈

溴酚蓝 (BPB) 作为一种酸碱指示剂, 会随着介质 pH 降低而变色, 利用发酵液褪色程度的不同可以定性和半定量地反应细菌溶磷能力的大小。本研究中与对照相比, 20 株溶磷细菌发酵液 $\text{pH} \in [4.16 - 5.47]$, 这说明 20 株溶磷细菌分泌了大量有机酸

降低了培养介质 pH 值而使 BPB 褪色。

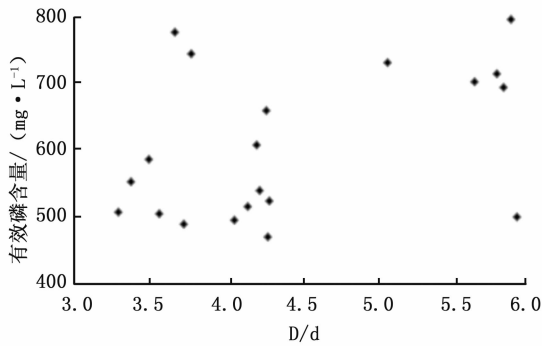


图2 溶磷细菌 D/d 与有效磷含量的相关性

2.2 溶磷细菌溶磷能力的测定

本研究利用碳酸钙作为唯一无机磷源,来测定菌株分溶无机磷能力的大小。20 株溶磷细菌在数量相同的情况下,可以看出,各处理发酵液中有有效磷含量均显著高于 CK ($54.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),说明各菌株对碳酸钙均有一定得溶解作用,且各处理间差异显著(表1)。与 CK 相比,有效磷含量增幅为 CK 的 8.7~14.7 倍。其中 NC285 在发酵液中的有效磷含量最高($794.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),溶磷率为 19.75%,将其选择为进一步研究的菌株。

2.3 溶磷细菌溶磷能力指标的相关性分析

本实验对 20 株溶无机磷菌株的 D/d 和溶磷量的相关分析表明,D/d 与溶无机磷细菌的溶磷量之间没有显著的相关性(图2)。如菌株 GZ087 的 D/d 最大,为 5.92,但其溶磷率仅为 11.87%(表1),故 D/d 的大小作为溶磷能力的恒定指标有待商榷。

表1 20 株溶无机磷细菌的溶磷能力测定

编号	D/d	pH	有效磷含量/ ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	溶磷率/ (%)
NC028	4.21	4.66 ± 0.04a	607.45 ± 6.63efg	14.75
NC098	3.38	4.97 ± 0.01bcd	552.58 ± 3.42cde	13.29
NC099	3.57	4.92 ± 0.06bcd	504.79 ± 7.2bcd	12.01
NC100	4.29	4.92 ± 0.02bcd	523.67 ± 4.1bcde	12.51
NC101	4.15	5 ± 0.05bcd	515.71 ± 3.7bcde	12.3
NC150	4.06	4.86 ± 0.11bc	495.65 ± 4.2bcd	11.77
NC151	4.23	4.89 ± 0.04bcd	539.31 ± 4.3bcde	12.93
NC285	5.88	4.16 ± 0.10ab	794.78 ± 3.1j	19.75
NC299	4.28	4.83 ± 0.20abc	470.28 ± 3.7bc	11.09
NC310	3.73	5.47 ± 0.24ab	489.45 ± 3.5bcd	11.6
GZ038	3.67	4.26 ± 0.04a	775.01 ± 5.5i	19.22
GZ039	5.07	4.64 ± 0.70ab	730.17 ± 3.2hi	18.02
GZ051	3.30	5.24 ± 0.26ab	507.15 ± 2.8bcd	12.08
GZ053	5.64	4.48 ± 0.67bcd	701.56 ± 6.7	17.26
GZ068	5.79	4.81 ± 0.57ab	713.65 ± 7.5hi	17.58
GZ075	3.78	4.36 ± 0.66ab	743.45 ± 5.1hi	18.37
GZ078	4.27	4.24 ± 0.07a	658.49 ± 6.9fgh	16.11
GZ080	3.5	5.06 ± 0.04d	585.92 ± 13.7def	14.18
GZ087	5.92	5.47 ± 0.10bcd	499.48 ± 8.6bcd	11.87
GZ092	5.83	4.76 ± 0.43ab	692.71 ± 14.7ghi	17.02
Ck	-	7.06 ± 0.36e	54.33 ± 4.3a	-

与未接种的 CK 培养液 pH(7.06)相比,接种后的各发酵液 pH 均有不同程度的下降,其 pH 在 4.16~5.47 之间,说明在培养过程中,细菌能够分泌一些酸性物质,导致 pH 下降,由图 3 可知,pH 与溶无机磷细菌的溶磷量之间存在极显著的负相关性关系($P < 0.01$)。因此,培养液 pH 可作为衡量溶无机磷细菌溶磷能力强弱的指标。

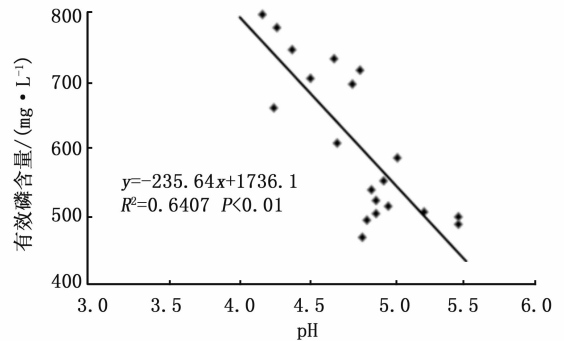


图3 溶磷细菌 pH 与有效磷含量的相关性

2.4 菌株鉴定

2.4.1 培养特征和形态特征观察 菌株 NC285 在 LB 培养基上生长较好,培养 48 h 后,菌落呈白色不透明圆形,边缘整齐,表面褶皱,好氧(图4)。

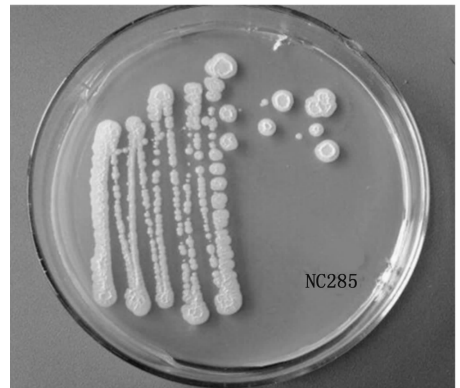


图4 菌株 NC285 的形态特征

2.4.2 生理生化特征 菌株 NC285 革兰氏阳性,有芽孢,接触酶、甲基红试验、伏普试验、淀粉水解反应为阳性;能利用柠檬酸,可使明胶液化;不能使硝酸盐还原,也不水解纤维素;可利用葡萄糖、蔗糖和甘露醇(表2)。

2.4.3 分子鉴定 菌株 NC285 在 Biolog 鉴定板上培养 16~24 h 的数据进行鉴定,其读数相似值(SIM)均大于 0.5,可视为系统确定的种属鉴定结果,菌株 NC285 鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

菌株 NC285 基因片段序列(1 460 bp)在 GenBank 及 EzTaxon 近缘种序列进行比对分析,结果显

表2 菌株 NC285 的主要生理生化特征

实验项目	NC285	实验项目	NC285
革兰氏染色	+	接触酶试验	+
芽孢染色	+	甲基红试验	+
淀粉水解试验	+	伏普试验	+
明胶液化试验	+	葡萄糖	+
硝酸盐还原试验	-	蔗糖	-
纤维素水解试验	-	麦芽糖	+
柠檬酸盐试验	+	甘露醇	+

示相似性在 97% 以上的均为 *Bacillus* 属,其中与 *Bacillus aryabhatai* 相似性最高,相似性达 99%。选择相似性在 98% 以上的同属和同种菌株序列,以 *Lactobacillus zae* 为外群,采用 Neighbor Joining 法构建系统发育树(图 5)可以看出,菌株 NC285 与 *Bacillus aryabhatai* 同一分支中,亲缘关系最近。

综合以上形态特征、生理生化特性、Biolog 鉴定及系统发育结果,最终确定该菌株为 *Bacillus aryabhatai*。向 GenBank 提交序列并获得登陆号为 KM244738。

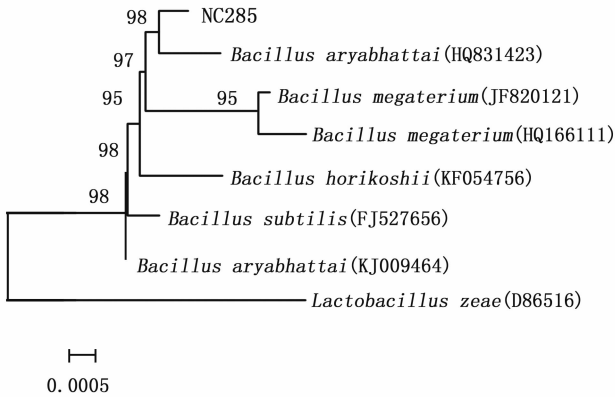


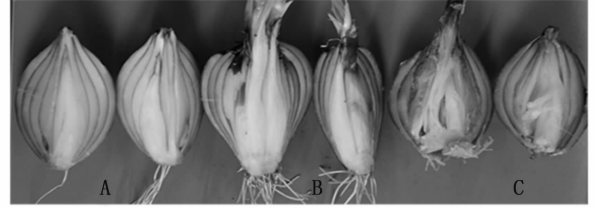
图5 基于 16S DNA 序列构建的 5 株溶磷细菌系统发育树

2.5 NC285 在洋葱上的毒力症状

洋葱鳞茎接种试验结果如图 6 所示,阳性对照标准菌株 LMG1222 接种 2 d 后,洋葱鳞茎表皮开始出现黄色病斑,5 d 后病斑不断扩大,直接达到 2~3 cm,切开发现,鳞茎内部和根部严重腐烂,呈黄褐色,并带有浓烈的恶臭味。接种的 NC285 菌株 5 d 不产生病斑,仅在接种点表皮产生很小的坏死斑点,继续培养,斑点没有扩大现象,切开后,内部没有异常变化,与阴性无菌水对照症状相同。由此推断,该菌株不是洋葱致病菌,说明 NC285 对洋葱没有致病性。

2.6 NC285 在苜蓿幼苗上的毒力症状

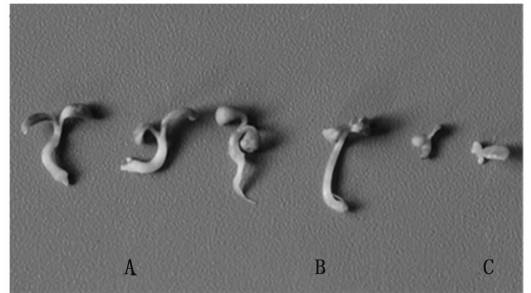
苜蓿幼苗接种 7 d 后结果如图 7 所示,接种



A 无菌水 B NC285 C LMG1222

图6 NC285 接种洋葱结果

LMG1222 标准菌株,96% 苜蓿幼苗表现出接种点周围坏死、黄化和根部短小的症状,对苜蓿生长产生明显的抑制作用。接种 NC285 菌株和无菌水的苜蓿幼苗表现一致,生长正常,成活率分别为 62%、66%。由此可以推断高效溶磷菌株 NC285 对苜蓿无致病性,安全性比较高。



A 无菌水 B NC285 C LMG1222

图7 NC285 接种苜蓿结果

2.7 毒力基因 cblA 的 PCR 检测

cblA 基因被认为是特定的毒力基因,且在大多数流行致病菌株中存在^[28],为更加准确的确定该菌株有无致命性,本实验利用 *cblA* 基因对菌株 NC285 进行毒力基因的检测,结果未检测到该毒力基因。这与苜蓿模型试验结果一致。最终可得出,菌株 NC285 (*Bacillus aryabhatai*) 无致病性,安全可靠。

3 结论与讨论

(1)随着溶磷细菌的重要性被人们逐渐认识,研究者们从不同林木植物根际土壤分离、筛选并鉴定出各种溶磷细菌。已报道的溶磷细菌主要有芽孢杆菌(*Bacillus*)、假单胞菌(*Pseudomonas*)、欧文氏菌(*Erwinia*)、土壤杆菌(*Agrobacterium*)、伯克霍尔德菌属(*Burkholderia sp.*)、黄杆菌(*Flavobacterium*)等^[29]。韩烁等^[30]研究毛竹根部溶磷细菌多样性中分离得到芽孢杆菌属和伯克霍尔德氏菌属溶磷菌株。王岳坤等^[31]在对海南生态区的主要经济林(包括橡胶树、桉树、台湾相思树、毛竹、香蕉、红树林等 21 种植物)研究中发现,在其根际土壤中分离筛选

出不动杆菌属、假单胞菌属、沙雷氏菌属、肠杆菌属。Arvind 等^[32]从喜马拉雅山脉高寒地区的沙棘根际土壤中,同样也筛选一株假单胞菌属的溶磷细菌。目前,鲜有关于 *Bacillus aryabhattai* 作为溶磷菌株的系统研究报道,为微生物肥料提供优质的菌种资源。

(2)有关溶磷细菌的溶磷机制较为复杂,最为常见的一种观点认为是由于溶磷细菌可分泌大量低分子量有机酸,这些有机酸既能降低 pH,又可与土壤中的 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Al^{3+} 等离子结合,使难溶性磷酸盐在酸性条件下被溶解,致使发酵液中的有效磷含量不断增加^[33],表明了溶磷细菌的溶磷量与培养液 pH 之间呈显著或极显著负相关性关系,即 pH 是菌株在溶磷过程的主要影响因素,本研究结果与贺梦醒^[34]、任嘉红^[21]、白文娟^[35]等研究结果一致。

(3)从溶磷能力上看,本研究筛选的高效溶磷细菌 NC285 的有效磷含量高达 $794.78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,溶磷率为 19.75%。就近几年的研究相比,白文娟等^[35]测得玉米根际溶磷细菌对无机磷溶解能力最大为 $108.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,有效磷含量仅为本研究的 1/7。朱培森^[9]等在对石灰性土壤中生长良好的野生植物根际溶磷细菌中研究中筛选出一株溶磷率高达 12.85% 的菌株,略小于本实验的溶磷率。而在任嘉红^[21]等研究得出的溶磷细菌 CLW17 (*P. fluorescens*)、JFW3 (*Bacillus cereus*) 的有效磷含量高达 $647.67 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $635.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,说明本试验分离得到的溶磷细菌 NC285 具有较高的商业价值和应用价值。

(4)溶磷细菌是近几年来研究的热点,对溶磷细菌的分离筛选有一套比较完整的研究系统,也筛选出了很多高效的菌株,但在其应用上研究比较匮乏,筛选出的高效溶磷菌,其安全问题大多被忽略。关于芽孢杆菌属安全性检测研究颇多,但大多数都使用动物模型试验,而国内外针对 *Bacillus aryabhattai* 菌株的安全性研究较少。植物模型被认为是一种有效的研究动物致病细菌的分子致病机制的手段,近年来研究表明,苜蓿可以作为医院呼吸道感染细菌的毒力测定植物模型。Bernier 等^[36]利用苜蓿模型可以简单快捷的检测出菌株对哺乳动物是否具有致病性。本研究在此基础上,利用苜蓿模型来对筛选出的高效溶磷菌株 NC285 进行简捷有效的毒性测定,发现 NC285 无致病性,安全性较高,这与李煜^[16]、李晶^[17]等以动物模型研究芽孢杆菌属安全性结果一致。通过对该高效溶磷菌株安全性的检

测,为其今后的应用提供理论依据。

参考文献:

- [1] 何方,何柏. 油茶栽培分布与立地分类的研究[J]. 林业科学, 2002, 38(5): 64-72.
- [2] 雷治国,黄永芳,何会蓉. 油茶及其种质资源研究进展[J]. 经济林研究, 2003, 10(4): 123-125.
- [3] 沈兴亮,焦如珍. 细菌肥料对油茶幼林生长的影响[J]. 林业科学研究, 2014, 27(4): 570-574.
- [4] Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2006, 71(2): 137-144.
- [5] Vassilev N, Medina A, Azcon R, et al. Microbial solubilization of rock phosphate on media containing agro-industrial wastes and effect of the resulting products on plant growth and P uptake[J]. Plant and Soil, 2006, 287(1-2): 77-84.
- [6] 陈隆升,陈永忠,马力. 油茶配方施肥技术研究进展[J]. 林业科技开发, 2011, 25(1): 6-10.
- [7] 许鹏波,薛立. 油茶施肥研究进展[J]. 中国农学通报, 2011, 27(8): 1-6.
- [8] Johnson S E, Loeppert R H. Role of organic acids in phosphate mobilization from iron oxide[J]. Soil Science Society of America Journal, 2006, 70(1): 222-234.
- [9] 朱培森,杨兴明,徐阳春,等. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用[J]. 应用生态学报, 2007, 18(1): 107-112.
- [10] 孙珊,黄星,范宁杰,等. 一株溶磷细菌的分离、鉴定及其溶磷特性研究[J]. 土壤, 2010, 42(1): 117-122.
- [11] Wakelin SA, Warren RA, Harvey PR, et al. Phosphate solubilization by *Penicillium* sp. closely associated with wheat roots. Biology and Fertility of Soils, 2004, 40(1): 36-43.
- [12] Wani PA, Khan MS, Zaidi A. Chromium reduction plant growth-promoting potentials and metal solubilization by *Bacillus* sp. isolated from alluvial soil. Current Microbiology, 2007, 54(3): 237-243.
- [13] 陈俊,陆俊银,康丽华,等. 红树林溶磷菌的初步鉴定、溶磷能力测定及其优化培养[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8): 1183-1188.
- [14] 杨芳,何园球,李成亮,等. 不同施肥条件下红壤旱地磷素形态及有效性分析[J]. 土壤学报, 2006, 43(5): 793-799.
- [15] 刘文干,何园球,张坤,等. 一株红壤溶磷菌的分离、鉴定及溶磷特性[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 326-333.
- [16] 李煜,赵素娟,张鹏,等. 17株蜡芽孢杆菌安全性评价[J]. 毒理学杂志, 2012, 26(3): 233-235.
- [17] 李晶,杨谦,张淑梅,等. 枯草芽孢杆菌 B29 菌株防治黄瓜枯萎病的田间效果及安全性评价初报[J]. 中国蔬菜, 2009: (2): 30-33.
- [18] Silo-Suh L, Suh S J, Sokol P A, et al. A simple alfalfa seedling infection model for *Pseudomonas aeruginosa* strains associated with cystic fibrosis shows AlgT (sigma-22) and RhlR contribute to path-

- ogenesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, 99(24): 15699 – 15704.
- [19] 鲁如坤. 土壤农业化学分析方法(第一版)[M]. 北京:中国农业出版社, 2000, 26: 147 – 159.
- [20] Mehta S, Nautiyal C S. An efficient method for qualitative screening of phosphate solubilizing bacteria. Current microbiology, 2001, 43(1): 51 – 56.
- [21] 任嘉红, 刘 辉, 吴晓蕙, 等. 南方红豆杉根际溶无机磷细菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学报, 2012, 53(3): 295 – 303.
- [22] Kundu B S, Nehra K, Yadav R, *et al.* Biodiversity of phosphate solubilizing bacteria in rhizosphere of chickpea, mustard and wheat grown in different regions of Haryana. Indian journal of microbiology, 2009, 49(2): 120 – 127.
- [23] 李 娟, 王文丽, 卢秉林, 等. 甘肃省河西高钙土溶磷菌筛选及其溶磷能力初步研究[J]. 干旱地区农业研究, 2008, 26(2): 8 – 9.
- [24] Buchana RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册. 中国科学院微生物研究所译. 北京:科学出版社, 1984.
- [25] Sambrook J, Fritsch ED, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- [26] 张立新, 宋江华. 不同来源的洋葱伯克氏菌基因型对洋葱的致病性分析[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 117 – 120.
- [27] 张立新, 宋江华, 谢关林. 洋葱伯克氏菌基因型的鉴定及其在苜蓿模型上的毒力分析[J]. 微生物学报, 2008, 48(11): 1445 – 1450.
- [28] Clode F E, Kaufmann M E, Malnick H, *et al.* Distribution of Genes Encoding Putative Transmissibility Factors among Epidemic and Nonepidemic Strains of *Burkholderia cepacia* from Cystic Fibrosis Patients in the United Kingdom[J]. Journal of clinical microbiology, 2000, 38(5): 1763 – 1766.
- [29] 戴沈艳, 申卫收, 贺云举, 等. 一株高效解磷细菌的筛选及其在红壤性水稻土中的施用效果[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 678 – 683.
- [30] 韩 烁, 夏冬亮, 李璐滨, 等. 毛竹根部解磷细菌的筛选及多样性研究[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(2): 26 – 31.
- [31] 王岳坤, 于 飞, 唐朝荣. 海南生态区植物根际解磷细菌的筛选及分子鉴定[J]. 微生物学报, 2009, 49(1): 64 – 71.
- [32] Arvind Gulati, Praveen Rahi, Pratibha Vyas. Characterization of Phosphate-Solubilizing Fluorescent Pseudomonads from the Rhizosphere of Seabuckthorn Growing in the Cold Deserts of Himalayas [J]. Curr Microbiol, 2008, 56: 73 – 79.
- [33] 韩玉竹, 赵建军, 曾 兵, 等. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定[J]. 草地学报, 2011, 19(5): 766 – 770.
- [34] 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.
- [35] 白文娟, 胡蓉蓉, 章家恩, 等. 玉米根际溶磷细菌的分离、筛选及溶磷能力研究[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(2): 167 – 176.
- [36] Bernier S P, Silo-Suh L, Woods D E, *et al.* Comparative analysis of plant and animal models for characterization of *Burkholderia cepacia* virulence[J]. Infection and immunity, 2003, 71(9): 5306 – 5313.