



不同条件下两株溶磷菌溶磷量及葡萄糖脱氢酶基因表达与酶活分析

杨美英^{**}, 王春红[#], 武志海, 于亭, 孙合美, 刘晶晶

吉林农业大学生命科学院/农学院, 吉林 长春 130118

摘要: 【目的】获得大豆根际土壤中溶磷能力较强的菌株, 明确在菌株溶磷过程中葡萄糖脱氢酶(GDH)的作用特点及其基因的表达水平。【方法】利用溶磷圈方法分离与纯化溶磷菌株, 采用Vitek 2系统和16S rRNA序列分析菌株的分类地位; 测定2菌株的溶磷量、GDH活性, 并根据GDH基因的保守区序列设计引物, 克隆GDH基因, 利用实时荧光定量PCR测定不同条件下基因的相对表达量。【结果】筛选出2株具有较强溶磷能力的溶磷菌, 分别鉴定为*Pseudomonas* sp.和*Enterobacter* sp., 2菌株最高溶磷量分别为558 $\mu\text{g/mL}$ 和478 $\mu\text{g/mL}$; 成功地克隆了2株溶磷菌的GDH基因, 片段大小分别为2007 bp和2066 bp; 2菌株在不同磷源、不同pH值培养基中GDH活性及基因表达量不同, 菌株wj1在高磷条件下基因表达量最高, 磷胁迫条件下基因表达量较低, 而wj3在不同磷源条件下GDH基因表达量都较低。且GDH基因表达量及酶活的变化与wj3菌株溶磷量没有直接的关系。【结论】从大豆根际土壤中分离获得溶磷能力较强的菌株*Pseudomonas* sp. wj1 和*Enterobacter* sp. Wj3, GDH活性及基因表达在2菌株溶磷过程中具有不同的作用特点, 2菌株溶磷机制不完全相同。

关键词: 溶磷菌, 溶磷量, 葡萄糖脱氢酶, *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp.

土壤磷素是植物生长发育所必需的重要营养元素之一, 根据土壤中存在的磷素化合物的性质, 通常将磷素分为有机磷和无机磷两大类。土壤中的有机磷来源于动、植物和微生物残体, 一般约占土壤全磷量的20%–80%^[1]。土壤中无机磷是植物所需磷素的主要来源, 大致可以分为水溶

态、吸附态和难溶态(或矿物态)3种形式^[2]。水溶态磷能被植物直接吸收利用, 土壤含量一般在0.003–0.300 mg/L之间。吸附态磷在土壤中的含量较低, 通常以 H_2PO_4^- 和 HPO_4^{2-} 形式为主, PO_4^{3-} 很少。土壤无机磷约有99%以矿物态存在, 包括含磷的原生矿物、次生矿物及其他含磷化合物。磷

基金项目: 国家自然科学基金(31201687)

*通信作者。E-mail: jlaumeiying@163.com

#并列第一作者。

收稿日期: 2015-07-06; 修回日期: 2015-10-05; 网络出版日期: 2015-12-09

灰石是土壤中常见的主要含磷原生矿物, 包括氟磷灰石[Ca₁₀(PO₄)₅F₂]、羟基磷灰石[Ca₁₀(PO₄)₅(OH)₂]和碳酸磷灰石3种类型的混合物或其中间产物。次生含磷矿物以磷铝石和粉红磷铁矿为主, 矿物中Fe、Al和H₂PO₄⁻组分可随pH而变化。其他含磷化合物则是指由肥料磷与土壤反应产生的溶解度较小的中间产物^[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溶磷微生物(Phosphate-solubilizing micro-organisms, PSM)。溶磷微生物的溶磷机理非常复杂, 一般认为有以下几个方面: 有机酸的酸解作用^[4], 溶磷微生物释放的有机酸可与阳离子发生交换作用或与Fe、Al、Ca、Mg等金属离子进行络合或螯合, 将与之结合的磷酸根释放出来; 当有效磷低于一定值时, 微生物和植物感受到低磷胁迫, 就会向胞外分泌酸性或碱性植酸酶和磷酸酶等物质, 将磷酸脂等有机磷矿化, 释放出有效磷。溶磷微生物的矿化作用易受环境因素的影响, 适宜的碱性环境更有利于其发挥作用^[5]。此外, Liu等^[6-7]研究发现, 一些溶磷能力较好的革兰氏阴性菌在壁膜空间中存在着直接氧化途径。该氧化途径的第一步是葡萄糖在葡萄糖脱氢酶(GDH)的作用下被氧化成葡糖酸, 葡糖酸进一步在葡萄糖酸脱氢酶作用下被氧化形成酸性极强的葡糖酮酸^[8], 然后被分泌到细胞壁和细胞膜之间, 使胞外环境酸度增高, 从而酸化难溶性钙磷化合物中的磷, 使其溶解。反应中的GDH是依赖于2,7,9-三羧基1H-吡咯-喹啉-4,5-二酮(PQQ)的醌蛋白家族中的成员之一^[9], 结合在细胞膜上^[10]。

近年来研究者对溶磷菌的GDH展开了一系列的研究。1990年Cleton-Jansen^[11]对编码*E. coli*的醌蛋白GDH基因进行了克隆、测序和图谱构建。2007年Tripura^[12]从*Enterobacter asburiae*菌株中克隆了2.4 kb的GDH基因, 并对该蛋白进行表达和

纯化。但关于GDH在微生物溶磷过程中的作用特点及微生物溶磷机制仍存在许多不明之处。本研究从大豆根际土壤中分离到2株溶磷能力较强的菌株, 命名为wj1与wj3。对这2株菌株进行Vitek 2和16S rRNA序列分析, 分别鉴定为*Pseudomonas* sp.和*Enterobacter* sp., 在克隆到2菌株GDH基因的基础上, 研究了不同环境条件下这2株溶磷菌溶磷过程中GDH酶活及基因表达量的变化, 为进一步明确GDH基因的表达量与溶磷的相关性, 揭示溶磷菌溶磷的动态变化机制提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 土壤采集: 本试验所用土壤取自吉林农业大学大豆试验地(东经125°19'、北纬43°43')的大豆根际土壤, 采集时间为2013年3月中旬。

1.1.2 主要试剂与仪器: 细菌总RNA提取试剂盒购自天根生化科技有限公司, 反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, 荧光定量PCR试剂盒SYBR Premix ExTaqTM及PCR扩增相关试剂、凝胶回收试剂盒、克隆载体pMD18-T均购自TaKaRa公司。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。ABI实时定量PCR仪为美国Applied Biosystems有限公司, DYY-6D电泳仪北京市六一仪器厂, 微量台式离心机德国Sigma公司, SPX-250BS-II生化培养箱上海新茵医疗器械制造有限公司, SW-CJ-2D型净化工作台为苏州净化设备有限公司, 722N-可见分光光度计为上海佑科仪器仪表有限公司。

1.1.3 实验所用引物: 本实验所用引物见表1。

1.1.4 培养基: (1) 溶无机磷细菌的分离培养基为NBRIIP (National Botanical Research Institute's phosphate) 培养基^[13], 培养基成分如下: 葡萄糖 10 g, Ca₃(PO₄)₂ 5 g, MgCl₂·6H₂O 5 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, KCl 0.2 g, (NH₄)₂SO₄ 0.1 g, 蒸馏

表 1. 本实验所用引物
Table 1. Primers used in this study

Primers	Sequence (5'→3')	Description
16S rRNA-F	AGAGTTTGATCATGGCTCAG	Identification of strain
16S rRNA-R	TACGGTTACCTGTACGACTT	Identification of strain
<i>gdh1</i> -F	CTGGATTGGTGGCAACTGGT	<i>gdh</i> cloning
<i>gdh1</i> -R	TCCTTGCCGGTGTAGGTCATC	<i>gdh</i> cloning
<i>gdh3</i> -F	TCTTCTTTGGCATCTGGCTG	<i>gdh</i> cloning
<i>gdh3</i> -R	ACTGCTTGCCATTCACTTCA	<i>gdh</i> cloning
G1-F	CCAGACCTACACCCGTAAGTCA	Target genes of wj1
G1-R	GCGTATTCTCCGATTCCG	Target genes of wj1
G3-F	GCTGCGTCGTCTGATTGTG	Target genes of wj3
G3-R	CAGGCGTGGATTCTGCGTT	Target genes of wj3
S1-F	GATAACGCTCGGAAACGGAC	Reference genes of wj1
S1-R	GGCTGCTGGCACAGAGTTAG	Reference genes of wj1
S3-F	CGTTACCCGCAGAAGAAGCA	Reference genes of wj3
S3-R	TCAAGGGCACAACTCCAAG	Reference genes of wj3

水1000 mL。固体培养基添加15g/L的琼脂粉。部分实验使用0.05%蛋白胨代替 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为氮源, 称作优化的NBRIP培养基。(2) LB培养基NaCl 10 g, 胰蛋白胨10 g, 酵母提取物5 g, 固体培养基加入15 g琼脂粉, 蒸馏水1000 mL, pH 7.0。

1.2 菌株的分离与鉴定

取1 g大豆根际土壤加入50 mL灭菌水, 30 °C摇床振荡1 h, 取上清液逐级稀释后, 分别取100 μL 涂布于NBRIP固体培养基上, 30 °C培养48 h, 挑取具有明显溶磷圈的菌落进行纯化。将纯化后的菌株于-80 °C保藏备用。

通过Vitek 2自动分析系统对菌株进行生化鉴定; 按照标准方法^[14]提取菌株的基因组DNA, 进行16S rRNA基因扩增。PCR所用引物(见表1)分别对应于大肠杆菌16S rRNA基因(GenBank序列号为J01859)的7-26位和1491-1512位^[15-16]。PCR产物送上海生工生物工程股份有限公司进行测序, 将获得的DNA序列, 输入GenBank, 用BLAST与数据

库中的序列进行同源性比较, 利用MEGA 5.0软件, 采用Neighbor-Joining (NJ)法构建菌株16S rRNA序列的系统发育树, 选择Bootstrap值为500, 距离系数为0.5, Kimura-2参数距离, 其它均为软件默认参数。并向GenBank提交序列并获得登录号。

1.3 菌株溶磷培养基的优化

采用 $L_{25}(5^3)$ 设计正交试验对溶磷菌溶磷过程中最佳培养基进行优化。以NBRIP培养基为基础, 对含1%(W/V)的碳源(葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露糖), 0.05%(W/V)的氮源(硝酸铵、硫酸铵、尿素、蛋白胨、牛肉膏)以及pH值(5、6、7、8、9)优化。种子液按1%接种量接种于培养基中, 于30 °C、150 r/min进行培养。利用钼蓝比色法测定菌液中可溶性磷的含量, 详细方法参照文献[17]。以优化的NBRIP培养基中加入5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 作为磷源, 每6 h取样1次, 测定2菌株96 h内的溶磷量。

1.4 GDH基因的克隆与序列分析

菌株Wj1的GDH基因保守区序列引物设计参照菌株*Pseudomonas* sp. TJI-51, 序列号为AEWE 01000115.1的GDH基因序列进行设计; 菌株Wj3的GDH基因保守区序列引物设计参照菌株*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ENHKU01, 序列号为CP003737.1的GDH基因序列进行设计。

以2种菌株的基因组DNA为模板, 分别以gdh1-F和gdh1-R, gdh3-F和gdh3-R为引物进行PCR扩增, 引物序列详见表1。PCR反应体系包括10×*ExTaq* buffer (Mg²⁺ Plus) 4 μL, dNTPs mixture 4.5 μL, TaKaRa *ExTaq* 0.3 μL, 模板1.0 μL, 上下游引物各1.0 μL, 用dd H₂O补足至50 μL。反应条件为: 94 °C 4 min; 94 °C 30 s, (50±10) °C 30 s, 72 °C 90 s, 33个循环; 72 °C 10 min。PCR产物由1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将检测正确的DNA片段经凝胶试剂盒回收与TA克隆载体pMD18-T连接。最后, 送上海生工生物工程公司进行测序。

1.5 荧光定量PCR

采用实时荧光定量PCR技术检测基因的相对表达量。菌体的培养条件如下: 将菌株在以Ca₃(PO₄)₂为唯一磷源的优化NBRIP液体培养基中进行培养, 接种量及培养条件同1.3菌株溶磷培养基的优化。其中96 h内菌株wj1和wj3 GDH基因表达量测定以5 g/L Ca₃(PO₄)₂为磷源, 12 h取样1次, 进行RNA提取。不同磷源条件设定如下: 无Ca₃(PO₄)₂、0.625 g/L Ca₃(PO₄)₂、1.25 g/L Ca₃(PO₄)₂、2.5 g/L Ca₃(PO₄)₂、5 g/L Ca₃(PO₄)₂和1 g/L K₂HPO₄, 分别于12 h和48 h取样测定。将优化的NBRIP液体培养液初始pH值分别调至5、6、7、8、9, 30 °C培养12 h和48 h后测定不同pH条件下2菌株的GDH基因表达量。

用细菌总RNA试剂盒提取2种菌株的RNA, 采用Easy Script™ First-strand cDNA Synthesis Super Mix反转录试剂盒合成cDNA。实时荧光定量PCR采用定量试剂SYBR Premix *ExTaq*™进行扩

增反应, 用Primer 5.0软件设计目的基因引物, 内参基因为16S rRNA (引物序列见表1)。

反应体系为20 μL, 包括SYBR Premix *ExTaq*™ II (2×) 10 μL, 上下游引物各0.8 μL, ROX Reference Dye (50×) 0.4 μL, cDNA模板1.0 μL, ddH₂O 6.0 μL。PCR反应条件为: 95 °C 10 min, 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 40个循环, 每个反应设置3次重复。利用Step One 生物软件和Microsoft Excel 分析处理实验结果, 参照ABI公司提供的ΔΔCt计算方法计算相对表达量。

1.6 菌株葡萄糖脱氢酶活性测定

葡萄糖脱氢酶活性测定方法如文献[18]。菌体的培养及取样条件同1.5荧光定量PCR中菌体的培养条件。将菌液10000 r/min离心10 min, 收集菌体, 加入10 mL 0.01 mol/L的pH 6.0磷酸缓冲液, 再加入2-巯基乙醇至1 mmol/L, 于冰浴中, 超声破碎30 min (50%功率, 工作10 s, 间歇20 s)。4 °C浸提3 h, 离心得上清液, 沉淀加2倍体积磷酸缓冲液(pH 6.0)得破碎细胞悬浊液。在破碎细胞悬浊液中加入Triton-X100至终浓度为1%, 在0 °C轻轻搅拌3 h, 4 °C浸提过夜, 12000 r/min离心10 min, 上清液即为葡萄糖脱氢酶粗酶液。25 °C条件下, 向比色皿中加入1 mL的50 mmol/L的pH 8.75 Tris-HCl缓冲液, 然后再分别加入20 mmol/L吩嗪硫酸甲酯、6.7 mmol/L 2,6-二氯酚钠(DCIP)以及1 mol/L葡萄糖各100 μL, 混合均匀,

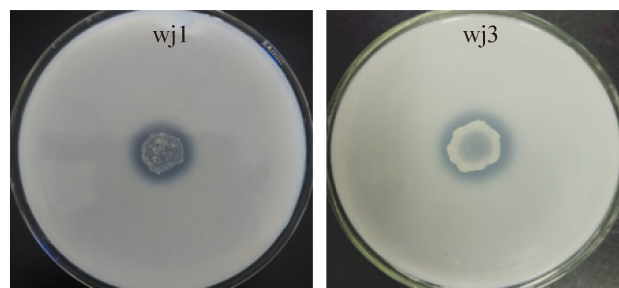


图1. 固体培养基溶磷菌产生的溶磷圈
Figure 1. Halo of phosphate-solubilization microorganism in solid media.

加入适量的酶液, 最后定容至3 mL, 测定每分钟600 nm下吸光值的变化。采用考马斯亮兰G-250法测定菌体总蛋白含量。酶活力单位(U)定义为: 25 °C条件下, 在1 min内能够使1 μmol的葡萄糖氧化(或1 μmol DCIP还原)的酶量。葡萄糖脱氢酶比活力以每单位总蛋白中酶的活力进行计算, 单位为U/mg。

2 结果和分析

2.1 溶磷菌株的分离

以Ca₃(PO₄)₂为唯一磷源的NBRIP培养基中筛选出2株具有明显溶磷圈的菌株, 多次纯化后仍表现出较好的溶磷效果, 将这2株菌株保藏于-80 °C中, 并分别命名为wj1和wj3菌株。

2.2 菌株的鉴定

两分离菌株经Vitek 2生理生化特性分别鉴定为*Pseudomonas* sp.和*Enterobacter* sp.。将菌株wj1和wj3的16S rRNA进行PCR扩增, 得到长度约为1.5 kb的扩增产物。将测序序列利用GenBank数据库进行BLAST同源性比较, 结果表明菌株wj1基因序列(登录号KM975675)与*Pseudomonas brassicacearum* strain IHBB 821(登录号KF475874.1)相似性最高为99%; 菌株wj3(登录号KM975676)与*Enterobacter asburiae* L1(登录号CP007546.1)相似性最高为99%。选择相似性较高的同属和同种菌株序列, 采用NJ法构建系统发育树(图2)。从图中可知, 假单胞菌和肠杆菌均分成两个主要的簇, 菌株wj1和wj3都位于第一个簇中, 分别与*Pseudomonas brassicacearum* strain IHBB 821和

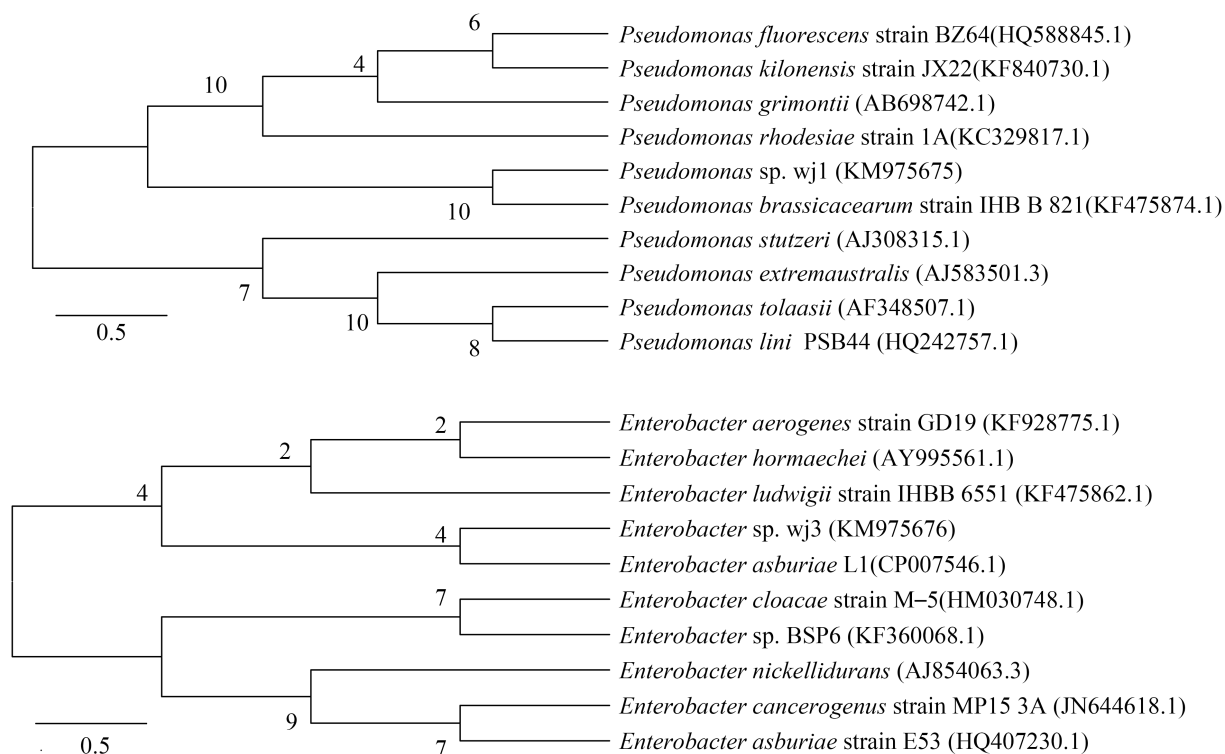


图 2. 菌株*Pseudomonas* sp. wj1与*Enterobacter* sp. wj3 16S rRNA基因序列进化树

Figure 2. Phylogenetic tree of strain *Pseudomonas* sp. wj1 and *Enterobacter* sp. wj3 based on 16S rRNA gene sequences. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap in 1000. Bar, 0.2 substitutions per nucleotide position and Kimura-2-parameter.

Enterobacter asburiae L1在同一分支上。

2.3 溶磷菌溶磷量的测定

从碳源、氮源、pH值3因素5水平进行正交试验,以获得溶磷优化培养基。结果显示葡萄糖为碳源,蛋白胨为氮源,pH 8时溶磷量最高(结果未出示)。为了研究不同时间内2菌株溶磷量的变化,将2菌株接种入优化的NBRIP培养基,测定了96 h内的溶磷量。从图3可以看出,2株菌株溶磷量变化均呈现先升高后平稳的趋势,wj1和wj3菌株在6 h后溶磷量出现明显增长,分别在42 h和36 h达到最大值,然后增长趋于缓慢。wj1和wj3在优化的溶磷培养基中可以释放大量的可溶性磷,最高量分别为558 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与478 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

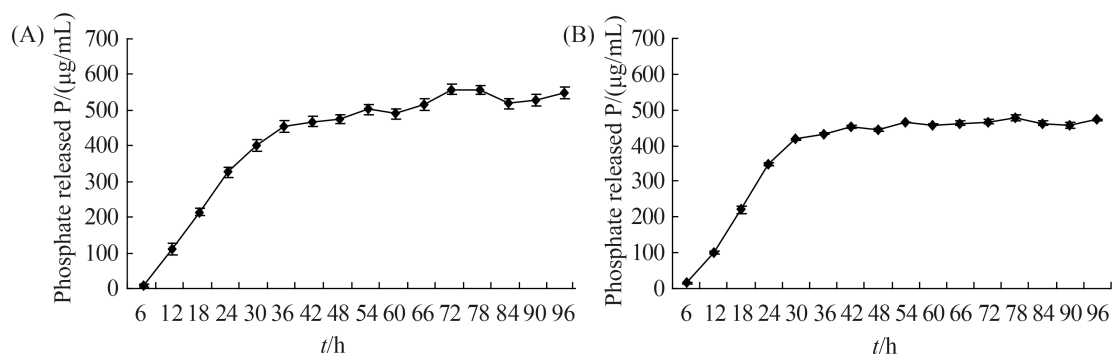


图 3. 96 h内菌株wj1 (A) 和wj3 (B)溶磷量

Figure 3. The phosphate solubilizing capacity of wj1 (A) and wj3 (B) in 96 h.

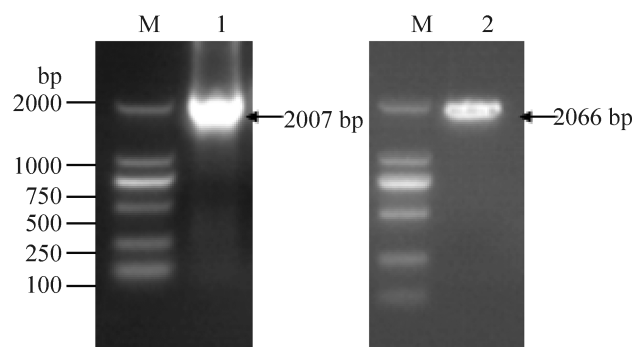


图 4. GDH 基因的扩增

Figure 4. Amplification of GDH gene. M: DL 2000; lane 1: PCR result of GDH gene of wj1; lane 2: PCR result of GDH gene of wj3.

2.4 两菌株GDH基因的克隆及序列分析

分别以wj1与wj3菌株基因组DNA为模板进行PCR扩增GDH基因序列。从图4可以看出,扩增产物条带清晰,特异性好,与目的片段大小相符。测序结果显示两目的片段大小分别为2007 bp和2066 bp。将序列利用BLAST进行搜索,结果如图5所示,两序列分别与序列号为cd10280的PQQ-mGDH具有一致的结构域,表明2菌株GDH基因克隆成功。

2.5 两株溶磷菌GDH基因表达量分析

2.5.1 96 h内菌株wj1和wj3 GDH基因表达量分析: 通过实时荧光定量PCR对优化的NBRIP培养基中的两种菌株GDH基因相对表达量随时间的动

态变化进行测定,结果如图6所示,可以看出,不同培养时间内,GDH基因表达量不同。96 h内菌株wj1 GDH基因表达量都要高于菌株wj3,菌株wj1在培养时间为48 h时表达量最高,菌株wj3在12 h时GDH基因表达量明显高于其他时间。

2.5.2 不同磷源培养基中菌株wj1和wj3 GDH基因表达量分析: 由图7可知,在不同磷源的培养基中,菌株wj1和wj3 GDH基因均有不同程度的表达。培养12 h时,菌株wj1在以 K_2HPO_4 作磷源的NBRIP培养基中相对表达量最高,其次为无 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的NBRIP培养基。48 h时在含 K_2HPO_4 磷源的NBRIP培养基中表达量最高,其次为在含

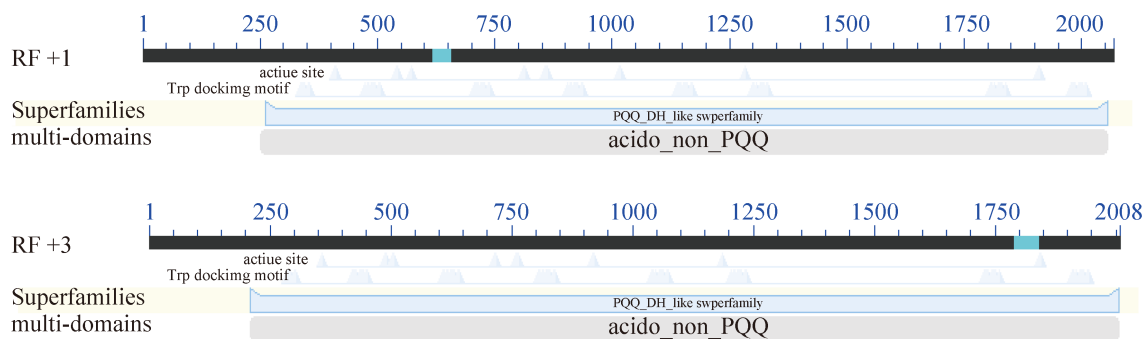


图 5. GDH基因序列的blastx分析

Figure 5. The BLASTx analysis of GDH gene sequences.

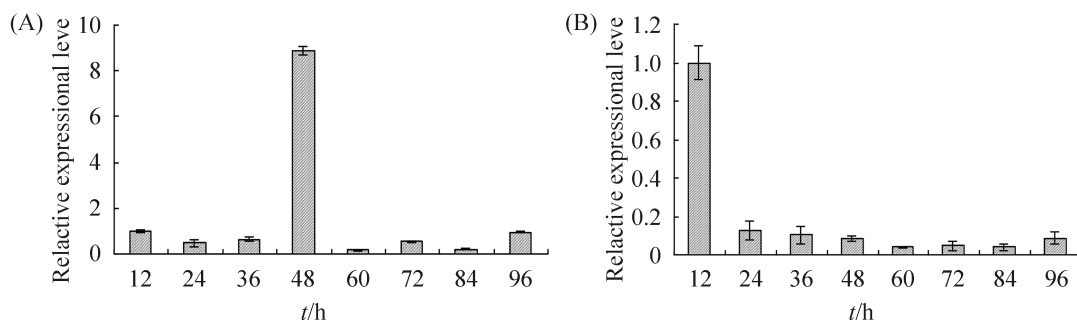


图 6. 96 h内菌株wj1(A)和wj3(B) GDH基因表达量变化

Figure 6. GDH genes expression level of wj1 (A) and wj3 (B) in 96 h.

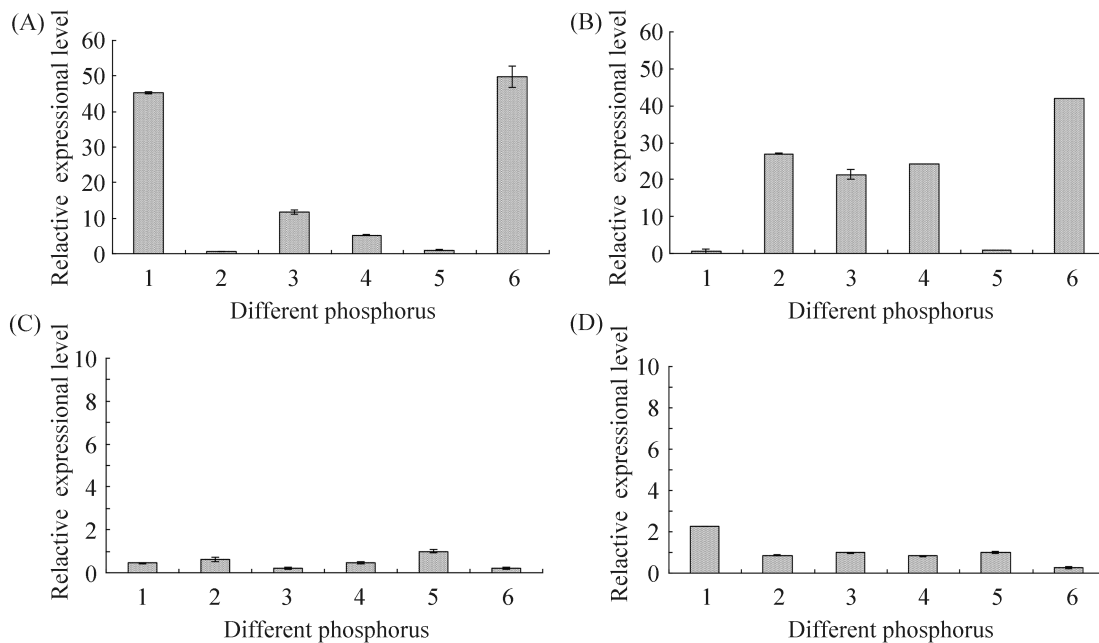


图 7. 菌株wj1和wj3在不同磷源培养基中GDH基因表达量变化

Figure 7. GDH genes expression analysis of wj1 and wj3 in different phosphate medium. A: wj1 12 h; B: wj1 48 h; C: wj3 12 h; D: wj3 48 h. 1: 0 g/L $Ca_3(PO_4)_2$; 2: 0.625 g/L $Ca_3(PO_4)_2$; 3: 1.25 g/L $Ca_3(PO_4)_2$; 4: 2.5 g/L $Ca_3(PO_4)_2$; 5: 5.0 g/L $Ca_3(PO_4)_2$; 6: 1.0 g/L K_2HPO_4 .

0.625 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基; wj3培养12 h和48 h时分别在含5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的NBRIP培养基与无 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 的NBRIP培养基中相对表达量最高,但各种磷源条件下GDH基因表达量差别并不明显。

2.5.3 不同初始pH的NBRIP培养基对菌株wj1和wj3 GDH基因表达量的影响:由图8可以看出,菌株wj1和wj3在不同初始pH值的NBRIP培养基中GDH基因均有表达。培养12 h和48 h时,菌株wj1分别在初始pH 5和初始pH 9的培养基中相对表达量最高,并且GDH基因的表达量随着培养时间的变化而不同, GDH基因的表达量48 h高于12 h的表达量; 12 h和48 h时wj3也分别在初始pH 5和初始pH 9的NBRIP培养基中表达量最高,其余pH值的培养基中表达量都较低,而且相差较小。菌株wj1和wj3都在48 h、初始pH 9的条件下GDH基因表达量达到最大值。

2.6 不同条件下两菌株GDH酶活测定

2.6.1 96 h内wj1、wj3 GDH酶活测定:由图9可

知,随着菌株培养时间的延长, wj1与wj3 GDH活性均呈现先升高后降低的趋势,并且96 h内wj1酶活都要明显高于wj3。wj1在12–48 h时酶活性逐渐升高,60 h时酶活性达到最高值,为2450.57 U/mg,之后酶活性逐渐下降;菌株wj3在12–36 h内酶活性逐渐上升,36 h时活性达到最大值,为21.62 U/mg,之后酶活力变化不明显。

2.6.2 不同磷源培养基中GDH酶活测定:分别以添加不同磷源的6个NBRIP培养基为基础,对wj1和wj3 GDH酶的比活力进行测定。从图10可以看出,在12 h和48 h时,不同含磷的培养基中GDH酶的比活力差异明显。菌株wj1 48 h时酶的比活力明显高于12 h的比活力,培养12 h时在以5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基中GDH酶的比活力最高,为671.53 U/mg。12 h时wj1 GDH酶的比活力强弱顺序依次为:5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、2.5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、0.625 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、1 g/L K_2HPO_4 、1.25 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、无 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基。48 h wj1菌株也是在以5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基中GDH酶

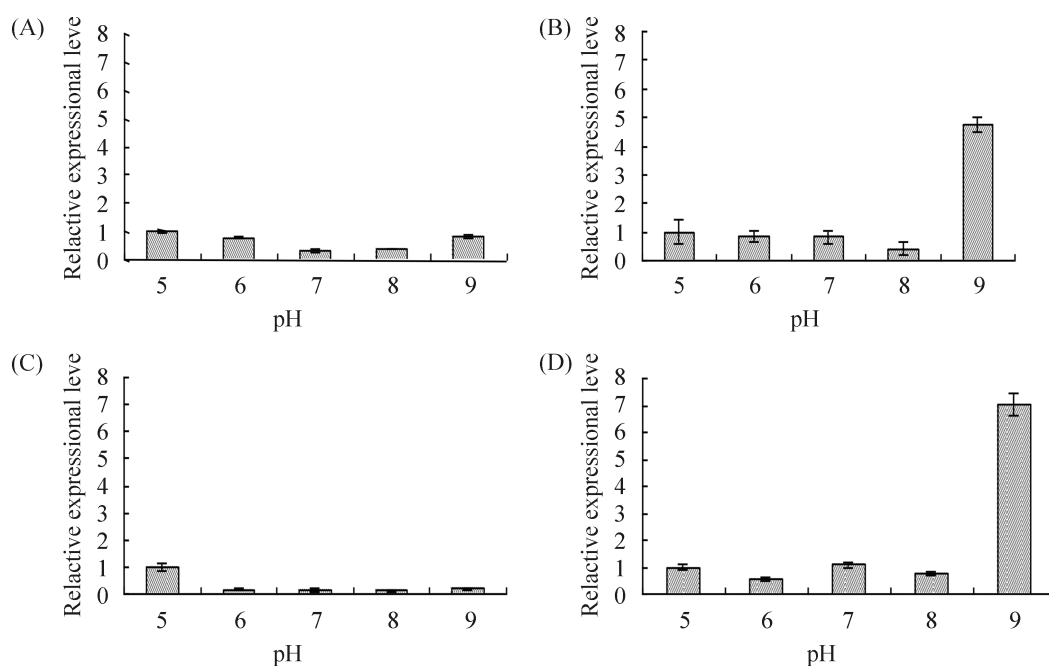


图 8. 菌株wj1和wj3在不同初始pH的溶磷培养基中GDH基因表达量变化

Figure 8. GDH genes expression analysis of wj1 and wj3 in different initial pH solubilizing phosphate media. A: wj1 12 h; B: wj1 48 h; C: wj3 12 h; D: wj3 48 h.

的比活力最高, 为2826.82 U/mg。48 h wj1 GDH酶的比活力强弱顺序依次为: 5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、2.5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、1.25 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、1 g/L K_2HPO_4 、0.625 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 、无 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基。12 h和48 h时菌株wj3 GDH酶的比活力明显低于wj1, 菌株wj3培养时间在12 h和48 h时酶的比活力均在以 5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 培养基中最高, 分别为24.23 U/mg和8.45 U/mg。

2.6.3 不同初始pH值的NBRIP培养基中GDH酶活测定: 不同初始pH条件下2菌株GDH酶的比活力如图11。由图可知: wj1 12 h时在初始pH为5-8的培养基中, 初始的pH值越高酶的比活力越低, 初始pH 9的培养基中菌株酶的比活力略高于初始pH 7的活力, 12 h时初始pH 5中酶的比活力最高。随着培养时间的延长, wj1在48 h时所有培养基的GDH酶的比活力都要高于12 h时的活力,

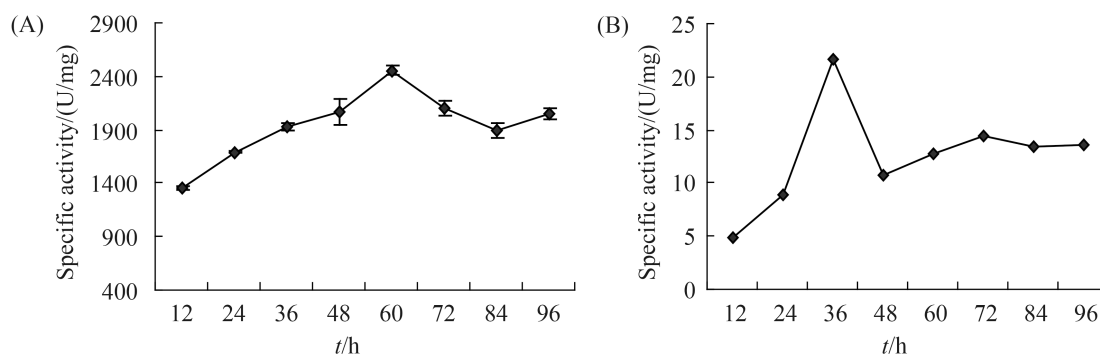


图 9. 96h内wj1 (A) 和wj3 (B) 的GDH酶活分析

Figure 9. The glucose dehydrogenase activity analysis of wj1 (A) and wj3 (B) in 96 h.

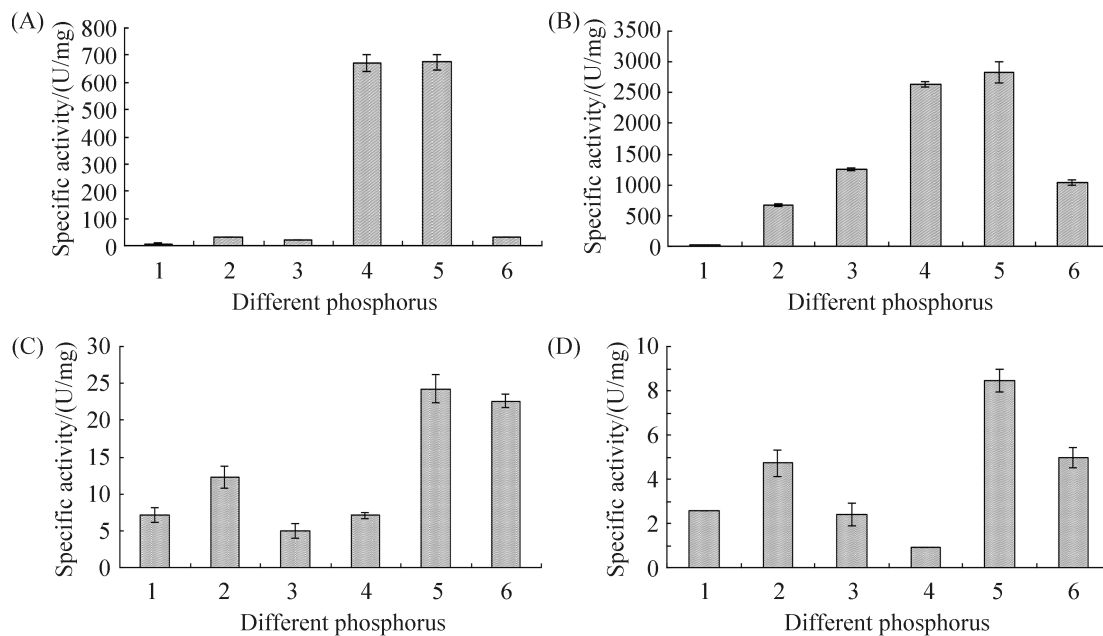


图 10. wj1和wj3不同磷源培养基中GDH酶活

Figure 10. The glucose dehydrogenase activity of wj1 and wj3 in different phosphorus medium. A: wj1 12 h; B: wj1 48 h; C: wj3 12 h; D: wj3 48 h. 1: 0 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 2: 0.625 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 3: 1.25 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 4: 2.5 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 5: 5.0 g/L $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$; 6: 1.0 g/L K_2HPO_4 .

初始pH 5的培养基酶的比活力最高, 初始pH 6、8、9的培养基中酶的比活力差异不明显, 初始pH 7的培养基酶的比活力最低; wj3酶的比活力明显低于wj1的活力, wj3在12 h时比活力高于48 h的

活力。wj3菌株12 h在初始pH为5和9的培养基中酶的比活力相对较高, 其余初始pH培养基中活力较低, 当培养到48 h时菌株的比活力都很低。从图11可知, 初始pH对wj3酶活力影响较小。

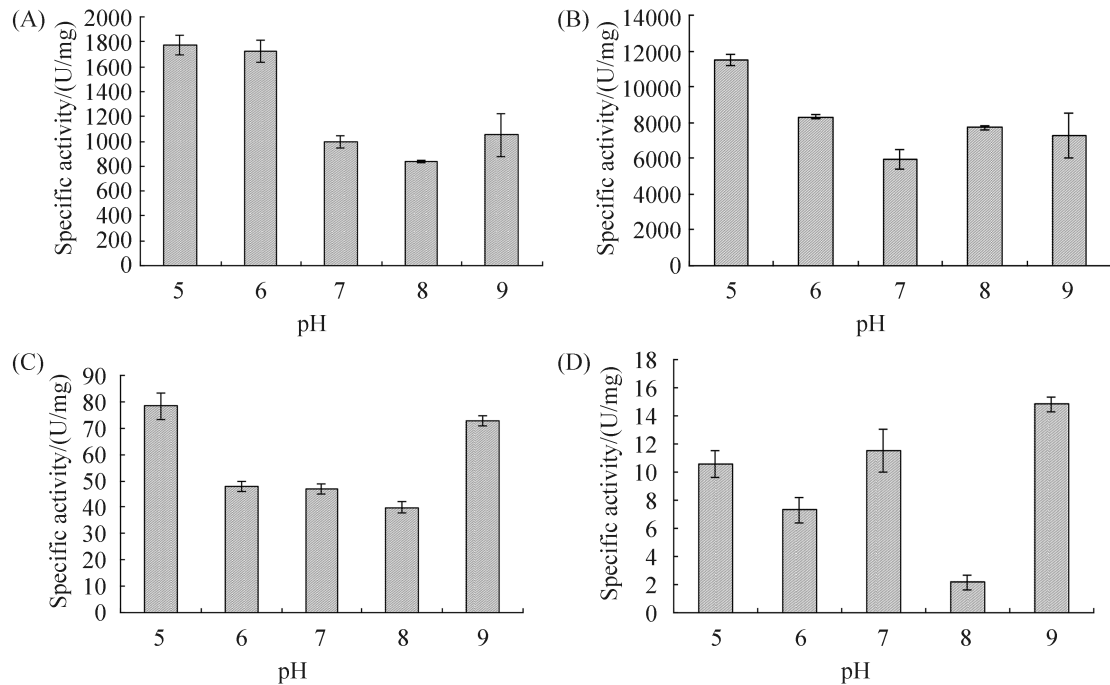


图 11. 菌株wj1和wj3在不同初始pH溶磷培养基中GDH酶活

Figure 11. The glucose dehydrogenase activity of wj1 and wj3 in different original pH solubilizing phosphate medium. A: wj1 12 h; B: wj1 48 h; C: wj3 12 h; D: wj3 48 h.

3 讨论

溶磷微生物能显著提高土壤中有效磷的含量, 减少土壤对磷酸盐的吸附固定, 被公认为安全、经济、高效的活化土壤难溶磷的生物措施。溶磷微生物种类繁多, 包括细菌、真菌和放线菌。其中, 报道最多的溶磷细菌主要有芽胞杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、肠细菌属(*Enterbacter*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)等^[19]。本研究从大豆根际土壤中分离到2株具有明

显溶磷效果的菌株wj1和wj3, 结合Vitek 2生理生化指标及16S rRNA序列综合分析鉴定, 菌株wj1和wj3分别属于假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)与肠杆菌(*Enterobacter* sp.)。彭帅等^[20]报道假单胞菌最大溶磷量达到24.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 伊璿等^[21]利用磷酸三钙作为磷源, 经过2 d培养发现肠杆菌释放可溶性磷为313.41 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而本试验中菌株wj1和wj3的最大溶磷量能分别达到558 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和478 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。表明这2株菌具有较强的溶磷能力, 利用这2株菌开发生物菌肥具有一定的可行性。

Sashidhar和Podile^[8]认为葡萄糖直接氧化成葡萄糖酸是革兰氏阴性细菌溶磷的主要机制, GDH

是该过程的关键酶之一, 溶磷菌中缺少GDH和PQQ基因, 均不能表现出溶磷功能^[7,22-23]。但也有研究表明不同微生物溶磷机制不同^[20], 微生物溶解难溶磷源是一个动态平衡过程, 微生物在其生长的同时通过自身的机制释放有效磷^[24]。本试验中菌株wj3在96 h内GDH基因表达量及酶活虽明显低于wj1, 最高值的酶活相差近100倍, 不同初始pH、不同磷源时, 2菌株GDH基因表达量与酶活也与上述结论相似, 但96 h内2菌株溶磷量不仅变化规律一致, 最高溶磷量之间也没有明显差别。说明GDH基因表达量及酶活的变化与wj3菌株溶磷量没有明显的直接关系, 两菌株溶磷可能存在不同的机制, 依赖于GDH的直接氧化途径并非wj3菌株溶磷的主要途径, 关于GDH与wj1菌株溶磷之间的关系仍需要进一步研究。伊黎等^[21]的研究也表明菌株生长在高磷和磷胁迫的条件下会影响溶磷量。本研究测定了不同磷源条件下的GDH基因表达量变化, 也得出一致的结论。菌株wj1在高磷条件下GDH基因表达量最高, 可溶性磷含量增加会促进基因的表达, 磷胁迫条件下GDH基因表达量较低, 而wj3菌株在不同磷源条件下GDH基因表达量都较低。

参考文献

- [1] Antoun H. Beneficial microorganisms for the sustainable use of phosphates in agriculture. *Procedia Engineering*, 2012, 46: 62–67.
- [2] Ding HX, Yu WT. Review on soil inorganic-P fractionation and the influential factors on P bio-availability. *Chinese Journal of Soil Science*, 2008, 39(3): 681–686. (in Chinese)
丁怀香, 宇万太. 土壤无机磷分级及生物有效性研究进展. *土壤通报*, 2008, 39(3): 681–686.
- [3] Zhang L, Wu N, Wu Y, Luo P, Liu L, Chen WN, Hu HY. Soil phosphorus form and fractionation scheme: a review. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2009, 20(7): 1775–1782. (in Chinese)
- 张林, 吴宁, 吴彦, 罗鹏, 刘琳, 陈文年, 胡红宇. 土壤磷素形态及其分级方法研究进展. *应用生态学报*, 2009, 20(7): 1775–1782.
- [4] Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, 1999, 17(4/5): 319–339.
- [5] Paul EA, Clark FE. *Soil microbiology and biochemistry*. San Diego, CA: Academic Press, 1988.
- [6] Liu ST, Lee LY, Tai CY, Hung CH, Chang YS, Wolfram JH, Rogers R, Goldstein AH. Cloning of an *Erwinia herbicola* gene necessary for gluconic acid production and enhanced mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli* HB101: nucleotide sequence and probable involvement in biosynthesis of the coenzyme pyrroloquinoline quinone. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(18): 5814–5819.
- [7] Babu-khan S, Yeo TC, Martin WL, Duron MR, Rogers RD, Goldstein AH. Cloning of a mineral phosphate-solubilizing gene from *Pseudomonas cepacia*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 972–978.
- [8] Sashidhar B, Podile AR. Mineral phosphate solubilization by rhizosphere bacteria and scope for manipulation of the direct oxidation pathway involving glucose dehydrogenase. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(1): 1–12.
- [9] Duine JA. Quinoproteins: enzymes containing the quinonoid cofactor pyrroloquinoline quinone, topaquinone or tryptophan-tryptophan quinone. *European Journal of Biochemistry*, 1991, 200(2): 271–284.
- [10] Buchert J, Viikari L. Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1988, 29(4): 375–379.
- [11] Cleton-Jansen AM, Goosen N, Fayet O, Van De Putte P. Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(11): 6308–6315.
- [12] Tripura C, Sudhakar Reddy P, Reddy MK, Sashidhar B, Podile AR. Glucose dehydrogenase of a rhizobacterial strain of *Enterobacter asburiae* involved in mineral phosphate solubilization shares properties and sequence homology with other members of enterobacteriaceae. *Indian Journal of Microbiology*, 2007, 47(2): 126–131.
- [13] Nautiyal CS. An efficient microbiological growth medium for

- screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 170(1): 265–270.
- [14] Habe H, Ashikawa Y, Saiki Y, Yoshida T, Nojiri H, Omori T. *Sphingomonas* sp. strain KA1, carrying a carbazole dioxygenase gene homologue, degrades chlorinated dibenzo-*p*-dioxins in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 2002, 211(1): 43–49.
- [15] Bakermans C, Madsen EL. Diversity of 16S rDNA and naphthalene dioxygenase genes from coal-tar-waste-contaminated aquifer waters. *Microbial Ecology*, 2002, 44(2): 95–106.
- [16] Wu CM, Gong M. Determination of nucleic acid composite preparation by phosphorus analysis. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 1997, 18(1): 44–45. (in Chinese)
吴春敏, 龚蜜. 定磷法测定复方制剂中核酸含量. *中国生化药物杂志*, 1997, 18(1): 44–45.
- [17] Huang J, Sheng XF, He LY. Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth-promoting endophytic bacteria of two crops. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(6): 710–716. (in Chinese)
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. *微生物学报*, 2010, 50(6): 710–716.
- [18] Hamamatsu N, Suzumura N, Nomiya Y, Sato M, Aita T, Nakajima M, Husimi Y, Shibana Y. Modified substrate specificity of pyrroloquinoline quinone glucose dehydrogenase by biased mutation assembling with optimized amino acid substitution. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73(3): 607–617.
- [19] Zhang AH, Yang QY, Chen YR, Yu GH. Breeding of P-decomposing strain and exploration for its fermentation condition. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2004, 31(3): 309–314. (in Chinese)
张爱华, 杨启银, 陈育如, 虞光华. 解磷细菌突变株PS-01P菌株的选育及发酵条件的研究. *安徽农业大学学报*, 2004, 31(3): 309–314.
- [20] Peng S, Han XR, Ma XY, Han M. Isolation and identification of gluconic-acid producing *Pseudomonas fluorescens* and phosphate dissolution. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 5: 137–141. (in Chinese)
彭帅, 韩晓日, 马晓颖, 韩梅. 产葡萄糖酸荧光假单胞菌的分离鉴定及解磷作用. *生物技术通报*, 2011, 5: 137–141.
- [21] Yi J, Gao X, An LJ. The study of phosphate solubilization mechanism of *Enterobacter aerogenes* PSB28. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(27): 245–249. (in Chinese)
伊鉴, 高晓蓉, 安利佳. 产气肠杆菌PSB28的解磷机理研究. *中国农学通报*, 2011, 27(27): 245–249.
- [22] Khairnar NP, Misra HS, Apte SK. Pyrroloquinoline-quinone synthesized in *Escherichia coli* by pyrroloquinoline-quinone synthase of *Deinococcus radiodurans* plays a role beyond mineral phosphate solubilization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 312(2): 303–308.
- [23] Kim KY, Jordan D, Krishnan HB. Expression of genes from *Rahnella aquatilis* that are necessary for mineral phosphate solubilization in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 1998, 159(1): 121–127.
- [24] Gothwal RK, Nigam V, Mohan MK, Samal D, Ghosh P. Phosphate solubilization by rhizospheric bacterial isolates from economically important desert plants. *Indian Journal of Microbiology*, 2006, 46(4): 355–361.

Phosphorus dissolving capability, glucose dehydrogenase gene expression and activity of two phosphate solubilizing bacteria

Meiying Yang^{*#}, Chunhong Wang[#], Zhihai Wu, Ting Yu, Hemei Sun, Jingjing Liu

College of Life Science/Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] To identify the function of glucose dehydrogenase (GDH) and gene expression level in the process of solubilizing phosphorus. [Methods] Phosphate solubilizing bacteria (PSB) were isolated and purified by soluble phosphorus circle method, and identified by Vitek 2 system and 16S rRNA sequence. The phosphate solubilization capacity and GDH activity of PSB were determined. GDH genes were cloned by PCR and the relative expression level of both genes under different conditions were determined by real-time quantitative PCR. [Results] Two PSB were identified as *Pseudomonas* sp. and *Enterobacter* sp. and the highest phosphorus solubilizing capability was 558 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the former and 478 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the latter. GDH genes of the two bacteria were cloned and the fragments were 2007 bp and 2066 bp. Different GDH activity and GDH gene expression were cultivated under the condition of different phosphorus sources and pH value. GDH gene expression of strain wj1 was higher than the other under high phosphorus, and the result was opposite under phosphorus stress. However, GDH gene expression of strain wj3 was lower in all phosphorus levels. The expression of GDH gene and the change of the enzyme activity were not obviously related with phosphorus solubilizing capability for strain wj3. [Conclusion] There were different characteristics of GDH activity and GDH gene expression in two isolated strains that have different phosphate solubilizing mechanisms.

Keywords: phosphate solubilizing bacteria (PSB), phosphate solubilization capacity, glucose dehydrogenase (GDH), *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp.

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31201687)

*Corresponding author. E-mail: jlaumeiying@163.com

#Contributed equally to this work.

Received: 6 July 2015; Revised: 5 October 2015; Published online: 9 December 2015