



一株寒地高效解无机磷细菌的分离鉴定及拮抗作用

朱德旋¹, 杜春梅^{1,2*}, 董锡文^{1,2*}, 薛春梅^{1,2}, 王瑞¹

¹佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007

²佳木斯大学应用微生物研究所, 黑龙江 佳木斯 154007

摘要:【目的】从北方寒地种植的不同农作物根际土壤中分离高效解磷的细菌, 为微生物制剂和磷肥的开发提供适于本地区的优良菌种。【方法】通过初筛和复筛从 26 株解磷菌中筛选获得一株高效解磷细菌, 对其进行生理生化和分子生物学鉴定, 同时采用钼蓝比色法测定解磷能力。采用平板对峙法测定拮抗植物病原菌能力。【结果】通过筛选后获得的菌株 B51-7 经鉴定为伯克霍尔德菌属。菌株在发酵液中可溶性磷含量最高达到 832.74 mg/L, 同时具有很强的广谱抑菌作用, 抑菌率最高为 89.71%, 可以显著促进水稻生长。【结论】菌株 B51-7 是一株具有生物防治作用的高效解磷细菌, 可应用于生物菌肥和生防制剂中。

关键词: 寒地, 解磷菌, 植物病原菌, 拮抗作用

磷是植物生长发育的必需元素, 主要从土壤中获取, 是植物体内很多重要化合物的组成成分, 参与细胞的物质代谢、能量代谢、信号传递等, 是农业生产的重要物质保障^[1-3]。由于土壤固磷作用的普遍存在, 可溶性磷肥的利用效率很低, 大部分磷肥作为无效态(难溶态)在土壤中积累, 提高土壤中磷的利用率成为广大研究者的热点课题之一^[4]。研究表明, 土壤中存在一些微生物, 能够将植物难以吸收利用的磷转化为可吸

收利用的状态, 这些微生物称为解磷菌^[5]。土壤中解磷菌的存在, 能够显著地增加土壤肥力, 增强土壤供磷能力, 提高作物对磷的吸收量和根系活力, 改善作物生物量和产量^[6-7]。此外, 部分解磷菌还可以抑制植物病原菌, 具有对人畜安全、对环境压力小、不易诱导病原菌产生抗药性等优点, 因而筛选出多功能的优良解磷菌菌株具有广阔的发展前景^[8]。

国内外许多学者先后从植物根际土壤中分离

基金项目: 佳木斯大学校长创新创业基金(XZYF2019-29); 北药与功能食品特色学科建设项目(2017); 黑龙江省自然科学基金(C2017064)

*通信作者。杜春梅, Tel/Fax: +86-454-8603986, E-mail: dcm_037@163.com; 董锡文, Tel/Fax: +86-454-8617776, E-mail: dongxiwen@126.com

收稿日期: 2019-11-05; 修回日期: 2020-01-06; 网络出版日期: 2020-05-29

获得具有解磷能力的解磷菌,并在解磷能力的测定、解磷机理以及农业应用等方面取得一定成果。大部分研究者分离获得的解磷菌只具有单一的解磷功能,如 Mamta 等^[9]从植物根系土壤获得一株高效解磷菌,可溶解难溶性磷,促进植物对磷的利用。但针对具有抑菌作用的解磷菌研究较少, Dipak 等^[10]在印度河水中获得一株能够产生抑菌活性物质的解磷菌,因受地域及环境的限制,未能广泛应用于世界各地。故筛选出适合当地使用的多功能解磷菌具有重要的实际应用意义。本研究拟从寒地植物根际土壤中筛选获得一株能够抑制植物病原菌的高效解磷细菌,以期为寒地土壤使用的解磷微生物肥料研发提供优良菌株。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源:植物根际土壤样品采自东北寒地(东经 130°49'30.26", 北纬 46°55'16.60"),采集生长状态良好的水稻、玉米和大豆根际土壤,除去植物根系表层约 5 cm 的土壤,用无菌铲采集深 5–15 cm 的根际土壤,每个取样点采集 3 份样品,将样品按编号装于自封塑料袋中,带回实验室。

1.1.2 供试植物病原真菌:番茄晚疫病菌(*Phytophthora infestans*)、茄子褐纹病菌[*Phomopsis vexans* (Sacc. Et Syd.) Harter]、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、辣椒疫病菌[*Phytophthora capsici* Leonian],由佳木斯大学张跃华老师提供;玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)、大豆疫病菌(*Phytophthora sojae*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*),由佳木斯大学李修平老师提供。

1.1.3 培养基:牛肉膏蛋白胨培养基^[11],马铃薯葡萄糖培养基(PDA)^[12],初筛培养基(PVK)^[13],复

筛培养基(NBRIP)^[14]。上述培养基中加入 1.8% 的琼脂粉使其成为固体培养基,7×10⁴ Pa 灭菌 30 min。

1.1.4 主要试剂及仪器:(1)试剂:3 mol/mL 硫酸溶液,2.5% 钼酸铵溶液,5% 抗坏血酸溶液,细菌 DNA 快速抽提试剂盒、SpanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒、Taq DNA 聚合酶和 dNTPs 购于生工生物工程(上海)股份有限公司,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

(2)钼蓝比色混合液:3 mol/L 硫酸溶液:去离子水:5% 抗坏血酸溶液:2.5% 钼酸铵溶液=1:2:1:1,按上述体积比例依次加入、混匀即为钼蓝比色混合液,现用现配。

(3)仪器:HC-2517 型高速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;22PC05299 型可见分光光度计,上海棱光技术有限公司;PHS-2C 型精密酸度计,杭州雷磁分析仪器公司;ZHWY-2102 型恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;Tgradient 型梯度 PCR 仪,Biometra 公司;DYY-6C 型电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 解磷菌的筛选

1.2.1 初筛:称取 10 g 鲜样,置于 90 mL 带玻璃珠的无菌水中,振荡 30 min,制成 10⁻¹–10⁻⁵ 系列梯度稀释的土壤溶液,取 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ 土壤稀释液 100 μL 涂布至 PVK 初筛平板上,每个梯度重复 3 次,28 °C 恒温培养 7 d。挑取产生透明圈的菌体划线至 NBRIP 复筛平板上,反复纯化 3 次,挑取单菌落转接于细菌试管斜面上,置于 4 °C 的冷藏箱中储存备用。

1.2.2 复筛:将纯化后的菌株接种于 100 mL 细菌液体培养中,37 °C、140 r/min 摇床培养 12 h 后,调节菌液浓度达到 10⁸ CFU/mL,制备成种子液。

1.2.3 测量: 取 20 μL 种子液滴加至 NBRIP 平板中央, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、恒温培养 7 d, 重复 3 次, 测量菌体直径(d)、透明圈直径(D)并计算 D/d。

1.3 菌株 B51-7 鉴定

1.3.1 菌株形态及生理生化试验: 观察牛肉膏蛋白胨培养基上菌株生长状态(包括菌落形态、颜色、透明度及表面结构等); 采用革兰氏染色法, 在油镜下观察菌体。

1.3.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析: 按照细菌 DNA 快速抽提试剂盒操作手册提取菌体 DNA, 16S rRNA 基因的 PCR 扩增正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 反向引物 1492R(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: DNA 模板 0.1 μL , 10 \times PCR Buffer 2 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTPs (each 10 mmol/L) 0.4 μL , 引物 27F (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , 引物 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 0.5 μL , *Taq* DNA Polymerase (5 U/ μL) 0.4 μL , ddH₂O 14.9 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后采用 SpanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。用 DNAMAN 软件进行序列拼接, 再将获得的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库做 BLAST 比对分析, 利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

1.4 菌株 B51-7 解磷能力的测定

制备菌株 B51-7 种子液。取 1 mL 种子液转接于 100 mL NBRIP 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 摇床培养 8 d, 同时以不接菌的 NBRIP 液体培养基为空白对照, 重复 3 次。取 1 mL 发酵液 12000 r/min 离心 5 min, 钼蓝比色法^[15]测定上清液中可溶性磷

含量, 酸度计测量 pH。

1.5 菌株 B51-7 拮抗植物病原菌能力的测定

采用平板对峙法^[16]。在 PDA 平板中央放置直径为 0.8 cm 的植物病原菌菌丝体。用移液枪吸取菌株 B51-7 种子液, 接种 4 滴在植物病原菌的周围, 每滴 20 μL 。以单独接种植物病原菌的平板为对照。28 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 待对照植物病原菌长满平板时测量植物病原菌直径、处理组抑菌圈直径(cm), 计算抑菌率。抑菌率^[17]=(1-处理组植物病原菌直径/对照组植物病原菌直径) \times 100%。

1.6 盆栽试验

- (1) 对照组(CK): 试验土壤+未加菌培养液;
- (2) 处理组(B51-7): 试验土壤+菌株 B51-7 种子液。

取培育生长状态良好且长势相同的水稻秧苗进行盆栽, 每盆移栽 2 株, 秧苗插入深度为 2 cm, 每个处理 3 次重复, 每间隔 1 个月, 等量施加相应培养液, 共施加 5 次, 在露天阳台上实施, 统一管理, 全程不施用任何肥料, 根据土壤状况和天气情况适时浇水除草。待水稻成熟后分别测定植株分蘖数、地上株高、地下根长和水稻千粒重; 同时, 采集水稻根际土壤, 测定土壤理化指标及土壤微生物数量^[18]。

1.7 数据分析

利用 SPSS 19.0 和 Origin 7.5 软件进行数据分析及图表制作。

2 结果和分析

2.1 解磷菌的筛选

利用 PVK 固体培养基从东北寒地土壤中初筛获得 26 株解磷菌。将 26 株解磷菌纯化培养, 利用 NBRIP 固体培养基进行复筛, 得到解磷能力

相对较弱的菌株 19 株, 得到具有明显解磷能力且产生较大透明圈的菌株 7 株, 后者中 2 株为解磷真菌, 5 株为解磷细菌; 解磷细菌革兰氏染色结果均为阴性杆菌, 且都可以利用柠檬酸盐, 分解葡萄糖产酸但不产气, 均不能产生 H_2S 、分解淀粉和精氨酸等。初筛及复筛具有典型透明圈的菌株 B51-7 如图 1 所示, 该菌株在复筛的平板上产生透明圈直径为 1.28 cm, 菌落直径为 0.71 cm, 且透明圈直径与菌落直径比值(D/d)高达 1.8, 此比值均高于其他菌株, 故以该菌株作为重点研究菌株。

2.2 菌株 B51-7 鉴定

2.2.1 菌株形态及生理生化试验: 菌株 B51-7 菌

落在牛肉膏蛋白胨培养基上形态规则, 呈圆形, 表面光滑, 乳白色且不透明, 不产色素; 革兰氏染色结果为阴性杆菌, 无芽孢; 生理生化测定结果如表 1 所示。

2.2.2 菌株 16S rRNA 基因序列分析:

将测序得到的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 根据同源序列进行系统发育树的构建。从图 2 可看出, 菌株 B51-7 与菌株(*Burkholderia vietnamiensis* LMG 10929)处于同一分支, 亲缘关系较近, 两者序列相似度达 99%, 且 B51-7 在进化树上处于伯克霍尔德属模式进化支之间, 所以菌株 B51-7 暂鉴定为伯克霍尔德属。

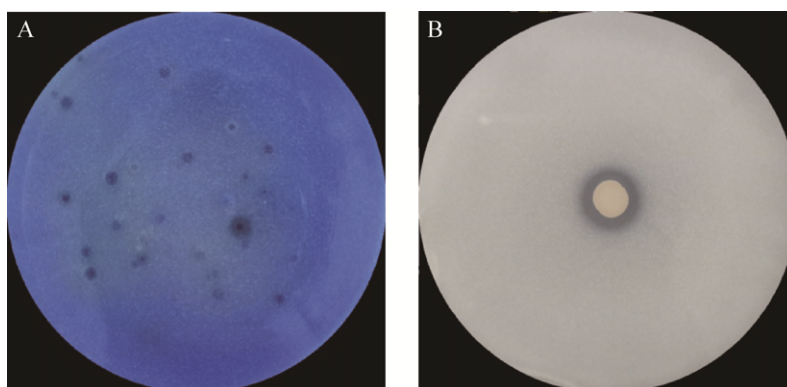


图 1. 菌株 B51-7 在 PVK 平板(A)和 NBRIP 平板(B)上的透明圈

Figure 1. Clear zones of strain B51-7 on PVK plate (A) and NBRIP plate (B).

表 1. 菌株 B51-7 的生理生化试验结果

Table 1. Physiological and biochemical test results of strain B51-7

Test items	Results	Test items	Results
Utilization of glucose	+N	Hydrogen sulfide test	-
Utilization of lactose	-N	Liquefaction test of gelatin	-
Utilization of sucrose	-N	Starch hydrolysis test	-
Utilization of maltose	-N	Decomposition oil test	+
Utilization of mannose	-N	Arginine double hydrolysis test	-
Indole test	+	Ornithine decarboxylase test	+
Methyl red test	-	Malonate test	-
Acetylmethyl methanol test	-	Oxidase test	-
Citrate test	+	Contact enzyme Test	-
Nitrate reduction test	-	Gram stain	-

+: positive (growth or reaction); -: negative (no growth or no reaction); N: no gas.

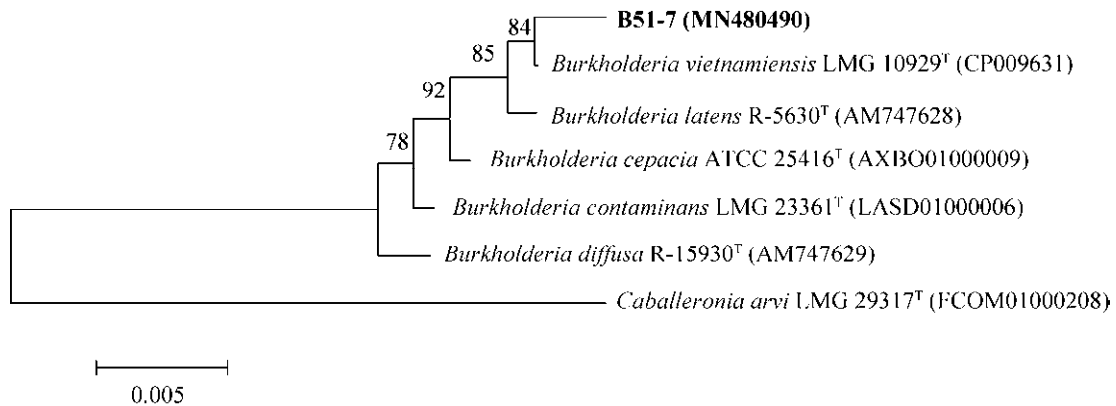


图 2. 菌株 B51-7 的系统发育树

Figure 2. The phylogenetic tree of strain B51-7.

2.3 菌株 B51-7 解磷能力的测定

对菌株 B51-7 进行解磷能力及 pH 测定。该菌株连续发酵培养 8 d, 其解磷能力随时间变化呈先升后降的趋势(图 3)。前 4 d 培养中, 解磷能力逐渐增加, 可溶性磷含量增幅明显($P<0.05$), 在第 4 天时, 发酵上清液中可溶性磷含量达 832.74 mg/L, 随后解磷能力下降。与初始 pH 值相比, 发酵液中 pH 值呈先降后升趋势。发酵培养第 2 天 pH 值降

到最低 4.12 ($P<0.05$), 与初始 pH 值 7.0 相比, 下降了 2.88; 发酵培养 4 d 后, pH 值逐步升高。初步推断该菌株是通过自身生长代谢产生一种或多种酸性物质, 将难溶性的磷酸三钙转化为可溶性磷, 具体转化机制尚待研究。

2.4 菌株 B51-7 拮抗植物病原菌能力的测定

通过平板对峙试验测定菌株 B51-7 拮抗多种植物病原菌的能力。结果显示菌株 B51-7 对 7 种

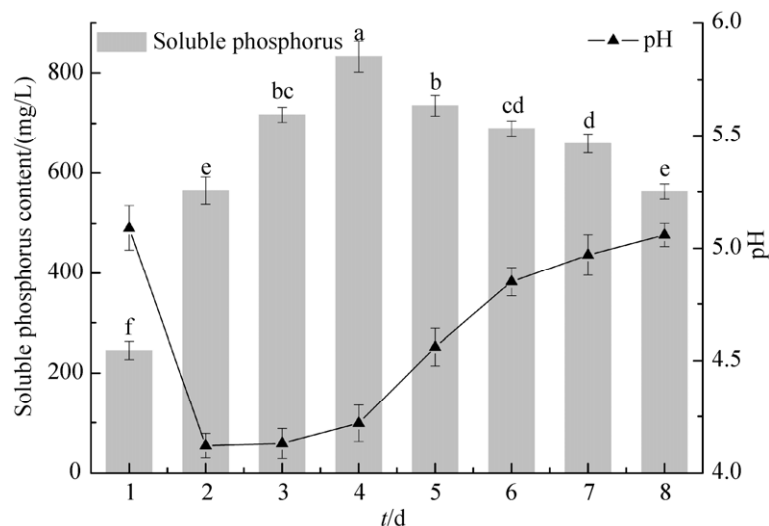


图 3. 菌株 B51-7 发酵液可溶性磷含量及 pH 变化

Figure 3. Soluble phosphorus content and pH in the fermentation broth of the strain B51-7. Different lowercase letters above the bars represent significant difference ($P<0.05$).

植物病原菌均有抑制作用, 如表 2 和图 4 所示, 对大豆疫菌、玉米大斑病菌和辣椒炭疽病菌的抑菌效果最明显, 其中对大豆疫菌抑菌圈直径高达 3.76 cm, 且与其他 6 种病原菌均有显著差异, 抑菌率达到了 89.71%; 玉米大斑病菌和辣椒炭疽病菌仅次于大豆疫菌, 抑菌圈直径分别为 3.30 cm 和 3.33 cm, 无显著差异, 抑菌率分别为 76.92% 和 76.47%; 菌株对植物病原菌水稻纹枯病菌、番茄晚疫病菌、辣椒疫病菌和茄子褐纹病菌均产生明

显的抑菌带, 其中水稻纹枯病菌抑菌圈直径最小, 为 1.97 cm, 与其他菌株均有显著差异, 抑菌率为 47.62%。因此, 菌株 B51-7 具有很好的生物防治潜质。

2.5 菌株 B51-7 对水稻根际土壤及生长的影响

通过测量水稻根际土壤的理化指标和微生物数量, 探讨菌株 B51-7 对水稻根际土壤的影响。结果如表 3 所示, 与对照组相比, 处理组土壤的含水量和有效磷显著升高, pH 和电导率显著下

表 2. 菌株 B51-7 抗植物病原菌活性

Table 2. Antibacterial activity of B51-7 strain on plant pathogens

Plant pathogens	Diameter of inhibition zone/cm	Antibacteria rate/%
<i>Rhizoctonia solani</i>	1.97±0.08d	47.62
<i>Phomopsis vexans</i> (Sacc.Et Syd.) Harter	2.74±0.12c	68.57
<i>Phytophthora infestans</i>	2.65±0.14c	65.67
<i>Setosphaeria turcica</i>	3.30±0.11b	76.92
<i>Phytophthora capsici</i> Leonian	2.80±0.08c	64.62
<i>Phytophthora sojae</i>	3.76±0.07a	89.71
<i>Colletotrichum capsici</i>	3.33±0.17b	76.47

The data are "mean±SD". Different letters in the same column show significant difference ($P<0.05$). The same as follows.

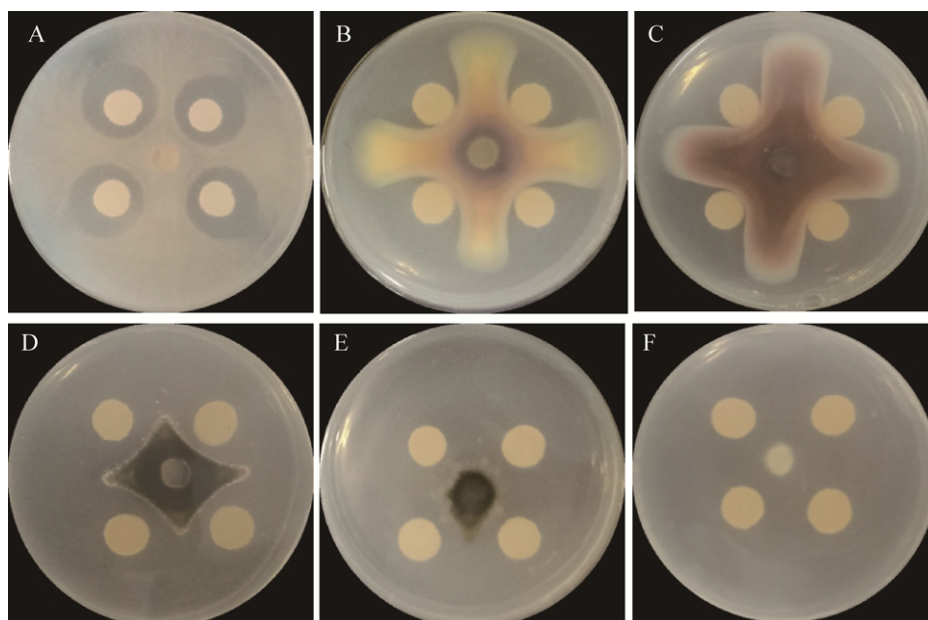


图 4. 菌株 B51-7 对 6 种植物病原菌的抑制作用

Figure 4. Inhibiting effects of strain B51-7 on six kinds of plant pathogens. A: *Rhizoctonia solani*; B: *Phytophthora infestans*; C: *Phytophthora capsici* Leonian; D: *Colletotrichum capsici*; E: *Setosphaeria turcica*; F: *Phytophthora sojae*.

表 3. 菌株 B51-7 对水稻根际土壤的影响

Table 3. Effects of strain B51-7 on rhizosphere soil of rice

Soil	Moisture content/%	pH	Electrical conductivity/($\mu\text{S}/\text{cm}$)	Available phosphorus/(mg/kg)	Bacteria/($\times 10^7$ CFU/g)	Fungi/($\times 10^6$ CFU/g)	Actinomyces/($\times 10^6$ CFU/g)
CK	19.26 \pm 0.53b	8.31 \pm 0.07a	420.00 \pm 8.16a	58.45 \pm 0.49b	11.5 \pm 0.76a	2.01 \pm 0.06a	9.77 \pm 0.12a
B51-7	21.09 \pm 0.85a	7.46 \pm 0.01b	376.67 \pm 9.43b	69.59 \pm 0.78a	11.64 \pm 0.33a	1.15 \pm 0.02b	0.96 \pm 0.04b

降；同时处理组土壤中细菌数量增加，真菌和放线菌数量显著减少。故施加菌株 B51-7 可以提高植物根际土壤有效磷含量，降低 pH，改良碱性土壤。

菌株 B51-7 对水稻生长的影响如表 4 所示，处理组水稻的分蘖数、地上株高、地下根长和千粒重均高于对照组；其中地上株高增加 21.7%，地下根长增加 61.3%，千粒重增加 9.2%，且均呈显著差异。故施用菌株 B51-7 可以促进植物生长，改善水稻产量。

3 结论和讨论

目前国内外有许多关于植物根际解磷菌的报道，其种类主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、固氮菌属(*Azoto-baeter*)、伯克氏菌属(*Burkholderia*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、泛菌属(*Pantoea*)等^[19-20]，Hani 等^[21]和 Mehta 等^[22]分别从不同农作物根际分离到解磷微生物。大量科研成果表明不同属的解磷菌株解磷能力有所差异。本研究从 3 种植物根系土壤分离获得解磷菌 26 株，经分子生物学鉴定主要有伯克霍尔德菌属和泛菌属等，其

解磷能力各不相同，相同培养条件下菌株 B51-7 的解磷能力表现出高于其他菌株。解磷能力的高低可能与增溶基因的直接表达有关，受菌株自身的遗传信息影响^[23]。

相同种属的解磷菌其解磷能力各有不同。戴沈艳等^[24]从江西红壤性水稻田中分离获得解磷菌为伯克霍尔德属，能够溶解少量的 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 。史国英等^[15]从广西甘蔗根际土壤中分离获得一株伯克霍尔德菌，可溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ，水溶性磷含量最高达到 305.85 mg/L。菌株 B51-7 是从黑龙江寒地黑土中分离获得一株伯克霍尔德菌，可溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ，可溶性磷含量最高为 832.74 mg/L。故同种菌株的解磷能力也受生境条件影响。

同一菌株在不同条件下其解磷能力也有所不同。王光华等^[25]表明同一菌株受环境诱导可能有多种溶磷机制，溶磷量的不同与溶磷菌产生的有机酸组成和数量变化有关。故相同条件下，菌株 B51-7 的解磷能力随时间的变化有所差异，主要是菌株自身代谢产生有机酸组成和数量受时间影响。同时随有机酸含量的积累与利用，菌体周围环境的酸碱度会有所改变，一般情况 pH 值与可溶性磷含量呈负相关，这与 Zheng^[26]等提出的观点相同。

表 4. 菌株 B51-7 对水稻生长的影响

Table 4. Effects of strain B51-7 on rice growth

Treatment	Tiller number	Aboveground plant height/cm	Underground root length/cm	1000-grain weight/g
CK	3.33 \pm 0.94a	63.13 \pm 2.15b	10.23 \pm 0.87b	23.26 \pm 1.31b
B51-7	3.67 \pm 0.94a	76.83 \pm 1.35a	16.50 \pm 0.70a	25.40 \pm 0.19a

伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)属对植物病原菌防治等方面具有很大应用潜力。在国外一些优势菌株已应用在实际生产中, 但我国关于 *Burkholderia cepacia complex*(Bcc)作为生物防治菌的研究报道较少^[27]。Li 等^[28]对洋葱伯克霍尔德菌进行深入研究, 表明该种菌株具有较高的生物防治价值。宫安东等^[29]筛选获得一株伯克霍尔德菌 WY6-5, 兼具溶磷和抑菌作用。因此, 有针对性地筛选适合当地应用的多功能解磷菌是本研究的重点, 而菌株 B51-7 作为伯克霍尔德菌属中的一员, 具有很强的广谱抑菌效果, 同时具有很高的解磷能力, 是一株多功能的生防菌, 可为多功能微生物制剂的研发提供优良菌株。

植物根际是一个很特别的微区域, 影响着周围微生物生长繁殖和代谢过程, 同时根际微生物也会影响植物的生长发育以及植物根际土壤的理化性质^[30-31]。由于菌株 B51-7 在生长过程中可以降低发酵液的 pH, 溶解 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, 故本试验以碱性土壤为盆栽土壤, 对各组水稻根际土壤的理化指标、微生物数量和水稻植株长势等指标进行显著分析。结果表明, 菌株 B51-7 能够提高土壤中有有效磷含量, 改善碱性土壤; 促进植物生长, 改善水稻产量, 与李乐等^[32]研究结果一致。故菌株 B51-7 在解磷菌肥等领域也具有良好的发展空间。

本研究从北方寒地分离的解磷菌株 B51-7 为伯克霍尔德菌。该菌株适合北方地理和土壤环境条件, 具有较强的解磷能力, 可溶性磷含量最高为 832.74 mg/L, 同时可以抑制多种植物病原菌, 具有良好的生物防治功能, 也可促进水稻的生长发育。因此, 菌株 B51-7 在生物肥料和生物农药领域具有良好的发展前景。

参考文献

- [1] Guo Y, Li YY, Jiang W, Luo Q, Guan ZB, Cai YJ, Liao XR. Isolation and identification of a phosphate solubilizing bacterium *Leuconostoc mesenteroides* and its ability to dissolve phosphorus. *Microbiology China*, 2018, 45(10): 2131–2141. (in Chinese)
郭渊, 李韵雅, 江威, 罗权, 管政兵, 蔡宇杰, 廖祥儒. 一株高效解磷肠膜明串珠菌的分离鉴定及解磷能力研究. *微生物学通报*, 2018, 45(10): 2131–2141.
- [2] Schröder JJ, Smit AL, Cordell D, Rosemarin A. Improved phosphorus use efficiency in agriculture: a key requirement for its sustainable use. *Chemosphere*, 2011, 84(6): 822–831.
- [3] Xu R, Liu JA, Zhou GY, Li DQ, Luo N, Huang X. Isolation, screening and identification of high-efficiency phosphate-solubilizing bacteria in rhizosphere of *Dalbergia odorifera* and *Sandalwood*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2015, 36(2): 281–288. (in Chinese)
徐睿, 刘君昂, 周国英, 李冬琴, 罗娜, 黄馨. 降香黄檀-檀香根际土壤高效解磷细菌的分离筛选与鉴定. *热带作物学报*, 2015, 36(2): 281–288.
- [4] Wang GH, Zhou DR, Yang Q, Jin J, Pan XW. Influence of soluble phosphate on rock phosphate solubilization by filtrate of phosphate-solubilizing fungi (PSF). *System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture*, 2005, 21(4): 275–279. (in Chinese)
王光华, 周德瑞, 杨谦, 金剑, 潘相文. 可溶性磷含量对溶磷真菌培养滤液溶解磷矿粉的影响. *农业系统科学与综合研究*, 2005, 21(4): 275–279.
- [5] Wang H, Wang JJ, Xu S, Zhao W, Han YF, Wang XB, Huang ZY. Screening and growth promoting characteristics of efficient organophosphate-degradation bacteria. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(5): 667–680. (in Chinese)
王欢, 王敬敬, 徐松, 赵维, 韩一凡, 王兴彪, 黄志勇. 有机磷降解菌的筛选及其促生特性. *微生物学报*, 2017, 57(5): 667–680.
- [6] Xing FF, Gao MF, Zhuo YY, Hu ZP, Li XZ. Screening and identification of phosphate solubilizing bacteria in *Hordeum vulgare* rhizosphere and its growth promoting effect. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2016, 31(S1): 252–257. (in Chinese)
邢芳芳, 高明夫, 嵯优优, 胡兆平, 李新柱. 大麦根际高效溶磷菌的筛选、鉴定及促生效果研究. *华北农学报*,

- 2016, 31(S1): 252–257.
- [7] Tang ZC. On the study of drought ecophysiology in plants. *Acta Ecologica Sinica*, 1983, 3(3): 196–204. (in Chinese)
汤章城. 植物干旱生态生理的研究. *生态学报*, 1983, 3(3): 196–204.
- [8] Zhang QX, Zhang Y, He LL, Chen XJ, Tong YH, Ji ZL. Identification of strain 7-5, antagonistic to *Rice Sheath Blight*, and preliminary study of its biocontrol mechanism. *Chinese Journal of Rice Science*, 2018, 32(3): 277–284. (in Chinese)
张清霞, 张迎, 何玲玲, 陈夕军, 童蕴慧, 纪兆林. 水稻纹枯病拮抗细菌 7-5 的鉴定及其生防机制初步研究. *中国水稻科学*, 2018, 32(3): 277–284.
- [9] Gupta M, Kiran S, Gulati A, Singh B, Tewari R. Isolation and identification of phosphate solubilizing bacteria able to enhance the growth and aloin-A biosynthesis of *Aloe barbadensis miller*. *Microbiological Research*, 2012, 167(6): 358–363.
- [10] Paul D, Sinha SN. Isolation and characterization of phosphate solubilizing bacterium *Pseudomonas aeruginosa* KUPSB12 with antibacterial potential from river Ganga, India. *Annals of Agrarian Science*, 2017, 15(1): 130–136.
- [11] Yin TT, Wang JJ, Liu Y, Liang YJ, Wang XB, Han YF, Wang X, Cheng MJ, Huang ZY. The screening of efficient phosphorus-solubilizing bacteria and the primary study on its mechanism of plant-growth-promoting. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(12): 234–242. (in Chinese)
银婷婷, 王敬敬, 柳影, 梁亚杰, 王兴彪, 韩一凡, 王夏, 程美娟, 黄志勇. 高效解磷菌的筛选及其促生机制的初步研究. *生物技术通报*, 2015, 31(12): 234–242.
- [12] Jiang HH, Qi PS, Wang T, Chen MN, Chi XY, Wang M, Chen N, Pan LJ. Isolation, identification and biological identification of phosphate-solubilizing fungi. *Chinese Journal of Soil Science*, 2018, 49(4): 856–861. (in Chinese)
姜焕焕, 祁佩时, 王通, 陈明娜, 迟晓元, 王冕, 陈娜, 潘丽娟. 盐碱地解磷真菌的分离鉴定及性能研究. *土壤通报*, 2018, 49(4): 856–861.
- [13] Zhu PM, Yang XM, Xu YC, Ouyang H, Shen QR. High effective phosphate-solubilizing bacteria: their isolation and promoting effect on corn seedling growth. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(1): 107–112. (in Chinese)
朱培淼, 杨兴明, 徐阳春, 欧阳红, 沈其荣. 高效解磷细菌的筛选及其对玉米苗期生长的促进作用. *应用生态学报*, 2007, 18(1): 107–112.
- [14] Yu QY, Ma ZY, Wang JF, Wei L. Screening of phosphorus solubilizing bacteria and its effects on transformation of soil inorganic phosphorus fractions. *Journal of Soil and Water Conservation*, 2012, 26(5): 103–107. (in Chinese)
于群英, 马忠友, 汪建飞, 卫林. 磷细菌筛选及其对土壤无机磷转化的影响. *水土保持学报*, 2012, 26(5): 103–107.
- [15] Shi GY, Mo YM, Cen ZL, Zeng Q, Yu GM, Yang LT, Hu CJ. Identification of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain BS06 and analysis on its phosphate solubilization ability. *Microbiology China*, 2015, 42(7): 1271–1278. (in Chinese)
史国英, 莫燕梅, 岑贞陆, 曾泉, 余功明, 杨丽涛, 胡春锦. 一株高效解无机磷细菌 BS06 的鉴定及其解磷能力分析. *微生物学通报*, 2015, 42(7): 1271–1278.
- [16] Liu HZ, Liu JC, Zhou JX. Research methods and agricultural application of microbial antagonism. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(3): 1310–1314, 1332. (in Chinese)
柳焕章, 刘建钊, 周敬霄. 微生物间拮抗的研究方法与农业应用. *安徽农业科学*, 2011, 39(3): 1310–1314, 1332.
- [17] Swain MR, Ray RC. Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiological Research*, 2009, 164(2): 121–130.
- [18] Zhang YX, Lei P, Xu ZQ, Feng XH, Xu H, Xu XJ. Screening of a high-efficiency phosphate solubilizing bacterium *Bacillus subtilis* JT-1 and its effects on soil microecology and wheat growth. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2016, 32(5): 1073–1080. (in Chinese)
张云霞, 雷鹏, 许宗奇, 冯小海, 徐虹, 许仙菊. 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. *江苏农业学报*, 2016, 32(5): 1073–1080.
- [19] Meng XK, Yu X, Zhu C, Huo ZP, Fan LC. Research and application advances in phosphate-solubilizing-microorganisms. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2018, 33(S1): 208–214. (in Chinese)
孟祥坤, 于新, 朱超, 胡兆平, 范玲超. 解磷微生物研究与应用进展. *华北农学报*, 2018, 33(S1): 208–214.
- [20] Zhao XR, Lin QM. A review of phosphate-dissolving microorganisms. *Soils and Fertilizers*, 2001, (3): 7–11. (in Chinese)

- 赵小蓉, 林启美. 微生物解磷的研究进展. 土壤肥料, 2001, (3): 7–11.
- [21] Antoun H, Beauchamp CJ, Goussard N, Chabot R, Lalande R. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, 1998, 204(1): 57–67.
- [22] Mehta P, Walia A, Shirkot CK. Functional diversity of phosphate solubilizing plant growth promoting rhizobacteria isolated from apple trees in the Trans Himalayan region of Himachal Pradesh, India. *Biological Agriculture & Horticulture*, 2015, 31(4): 265–288.
- [23] Zeng QG, Wu XQ, Wang JC, Ding XL. Phosphate solubilization and gene expression of phosphate-solubilizing bacterium *Burkholderia multivorans* WS-FJ9 under different levels of soluble phosphate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2017, 27(4): 844–855.
- [24] Dai SY, Shen WS, He YJ, Chen WW, Zhong WH. Screening of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its application in red paddy soil to Rice cultivation. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 2011, 17(5): 678–683. (in Chinese)
戴沈艳, 申卫收, 贺云举, 陈雯雯, 钟文辉. 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. 应用与环境生物学报, 2011, 17(5): 678–683.
- [25] Wang GH, Zhou KQ, Zhou DR, Yang Q, Zhao Y. Comparative study the biosolubilization of different insoluble phosphates by 3 phosphate-solubilizing fungal isolates. *Chinese Journal of Soil Science*, 2004, 35(4): 462–465. (in Chinese)
王光华, 周克琴, 周德瑞, 杨谦, 赵英. 三种溶磷真菌对不同磷源溶解效果的比较研究. 土壤通报, 2004, 35(4): 462–465.
- [26] Zheng BX, Ibrahim M, Zhang DP, Bi QF, Li HZ, Zhou GW, Ding K, Peñuelas J, Zhu YG, Yang XR. Identification and characterization of inorganic-phosphate-solubilizing bacteria from agricultural fields with a rapid isolation method. *AMB Express*, 2018, 8: 47.
- [27] Sijam K, Dikin A. Biochemical and physiological characterization of *Burkholderia cepacia* as biological control agent. *International Journal of Agriculture & Biology*, 2005, 7(3): 385–388.
- [28] Li W, Roberts DP, Dery PD, Meyer SLF, Lohrke S, Lumsden RD, Hebbar KP. Broad spectrum anti-biotic activity and disease suppression by the potential biocontrol agent *Burkholderia ambifaria* BC-F. *Crop Protection*, 2002, 21(2): 129–135.
- [29] Gong AD, Zhu ZY, Lu YN, Wan HY, Wu NN, Dimuna C, Gong SJ, Wen ST, Hou X. Functional analysis of *Burkholderia pyrrocinia* WY6-5 on phosphate solubilizing, antifungal and growth-promoting activity of Maize. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(9): 1574–1586. (in Chinese)
宫安东, 朱梓钰, 路亚南, 万海燕, 吴楠楠, Dimuna C, 龚双军, 文淑婷, 侯晓. 吡咯伯克霍尔德菌 WY6-5 的溶磷、抑菌与促玉米生长作用研究. 中国农业科学, 2019, 52(9): 1574–1586.
- [30] Du L, Chen G, Wang SP, Hong J, Huang X, Zhang LH, Ye LX, Zhang GY, Lian ZC. Effects of phosphate-solubilizing bacteria on rhizosphere microorganism and enzyme activities of lettuce. *Hubei Agricultural Sciences*, 2019, 58(11): 70–74. (in Chinese)
杜雷, 陈钢, 王素萍, 洪娟, 黄翔, 张利红, 叶莉霞, 张贵友, 练志诚. 解磷菌剂对生菜根际土壤微生物数量和酶活性的影响. 湖北农业科学, 2019, 58(11): 70–74.
- [31] Ma DY, Guo TC, Song X, Wang CY, Zhu YJ, Wang YH, Yue YJ, Cha FN. Effects of urea application rate on the quantity of microorganisms and activity of enzymes in wheat rhizosphere. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(12): 5222–5228. (in Chinese)
马冬云, 郭天财, 宋晓, 王晨阳, 朱云集, 王永华, 岳艳军, 查菲娜. 尿素施用量对小麦根际土壤微生物数量及土壤酶活性的影响. 生态学报, 2007, 27(12): 5222–5228.
- [32] 李乐. 林下山参根区土壤溶磷菌的筛选及对人参生长作用的研究. 中国农业科学院硕士学位论文, 2017.

Identification and antagonism activity of an inorganic phosphorus-dissolving bacterial strain isolated from cold region

Dexuan Zhu¹, Chunmei Du^{1,2*}, Xiwen Dong^{1,2*}, Chunmei Xue^{1,2}, Rui Wang¹

¹ College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

² Institute of Applied Microbiology, Jiamusi University, Jiamusi 154007, Heilongjiang Province, China

Abstract: [Objective] In order to find strains suitable for the development of biocontrol agents and biophosphate fertilizer, bacteria with high phosphorus-dissolving efficiency were isolated from the rhizosphere soils of different crops planted in the cold region of north China. [Methods] A highly effective phosphorous-dissolving bacterium was obtained from 26 bacterial strains with phosphorous-dissolving activity through preliminary and second screening. The bacterial strain was identified through physiological, biochemical and molecular biological methods, and its phosphorus-dissolving activity was tested by molybdenum blue colorimetry method. Meanwhile, the antagonism activity to several plant pathogens was determined by plate confrontation method. [Results] Strain B51-7 was obtained by the screening and identified as *Burkholderia* sp.. The soluble phosphorus content of the strain B51-7 in the fermentation broth reached 832.7 mg/L. Meanwhile, this strain had a broad-spectrum antifungal activity with the highest antagonism rate of 89.71%. A pot experiment showed that the growth of rice was significantly promoted by inoculation of strain B51-7. [Conclusion] Strain B51-7 was a highly effective phosphate-dissolving bacterium with biological control effect, and could be applied for making biological fertilizers and biocontrol agents.

Keywords: cold region, phosphorus bacteria, plant pathogens, antagonism activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the Jiamusi University President Innovation and Entrepreneurship Fund Project (XZYF2019-29), by the Northern Medicine and Functional Food Specialty Discipline Construction Project (2017) and by the Heilongjiang Provincial Natural Science Foundation Project (C2017064)

*Corresponding authors. Chunmei Du, Tel/Fax: +86-454-8603986, E-mail: dcm_037@163.com; Xiwen Dong, Tel/Fax: +86-454-8617776, E-mail: dongxiwen@126.com

Received: 5 November 2019; Revised: 6 January 2020; Published online: 29 May 2020