

# 缩二脲降解菌在作物根际的 GFP 标记示踪

平泉瑞 陆艳娜 黄为一<sup>†</sup>

(南京农业大学生命科学学院微生物学系, 南京农业大学农业部环境微生物重点开放实验室, 南京 210095)

**摘要** 通过三亲结合对缩二脲降解菌 GW-1 菌株成功进行了绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 基因标记, 标记菌株命名为 GW-1-GFP。实验证明外源质粒对宿主菌的生长未带来不利的影响, 且经高效液相色谱测定该标记菌株降解缩二脲的能力与出发菌株无显著差异 ( $p < 0.05$ )。经抗生素抗性和荧光追踪证明标记菌株 GW-1-GFP 能够很好地在土壤中定殖, 第 25 天时在不同处理的土壤中标记菌株对缩二脲的降解能力都超过 50%, 45 d 后该标记菌株在土壤中已难以检测。经标记菌株 GW-1-GFP 菌悬液浸润的小麦种子发芽后, 通过荧光观察显示降解缩二脲的标记菌株 GW-1-GFP 在小麦根部定殖良好, 且该标记菌株能在一定程度上缓解缩二脲对小麦的毒害作用。该研究为验证、追踪土壤中功能微生物菌剂与作物根部的亲和性和生态有效性提供了简易、直观的检测方法。

**关键词** 缩二脲降解; *gfp* 标记微生物菌剂; 定殖示踪; 土壤; 小麦根际

**中图分类号** S154.36 **文献标识码** A

尿素和含尿素复合肥在制造过程中往往因温度控制不当产生缩二脲<sup>[1-2]</sup>。含缩二脲的肥料直接施用于农田土壤或作物, 都易造成作物烧苗烧根等现象<sup>[3-5]</sup>。有研究表明, 在土壤中缩二脲能被细菌和真菌作为氮源利用, 但利用速度很缓慢<sup>[6-7]</sup>, 在好氧条件下 5~8 周内只有 15%~21% 的外加缩二脲能被矿化<sup>[8-9]</sup>。而在田间施用高效的降解缩二脲的微生物制剂可望成为克服缩二脲对作物毒害作用的有效措施。

本实验室从土壤中分离得到一株缩二脲降解菌, 命名为 GW-1, 经鉴定为土生克雷伯氏菌。前期的实验表明该菌株具有很好的缩二脲降解能力, 具有开发成为降解缩二脲的微生物制剂的潜力, 但该菌在农田生态、作物根际的行为如何缺少科学证明。本研究通过三亲结合对该缩二脲降解菌株 GW-1 进行了绿色荧光蛋白 (Green fluorescent protein, GFP) 基因标记, 并对标记菌株的稳定性、降解性、以及在不同土壤条件下降解缩二脲的能力、对作物根部的影响进行了研究, 通过建立标记缩二脲降解菌 GW-1 在小麦根际是否定殖和是否与根部友好的观察方法, 为研究农田微生物制剂在根际的分布和有效性提供了科学、简易、直观的示踪方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

**1.1.1 菌株与质粒** GW-1: 氨苄青霉素和四环素抗性, 系本实验室从校园土壤中分离的一株高效缩二脲降解菌株。

pPZP201-*gfp*: *Spe*<sup>r</sup>, 将组成型 *gfp* 基因克隆至广宿主质粒 pPZP201 获得的标记载体, 本实验室构建的 *gfp* 标记载体, 保存在 *E. coli* DH5 $\alpha$  中。

pRK2013: *mob*<sup>+</sup>, *tra*<sup>+</sup>, *Km*<sup>r</sup>, 协助质粒, 保存在 *E. coli* HB101 中, 由本系环境微生物工程实验室制取, 采用 LB 培养基进行培养。

**1.1.2 土样及有机肥** 供试土样采自南京农业大学校园, 含有机质 15.4 g kg<sup>-1</sup>, 全氮 10.3 g kg<sup>-1</sup>, 全磷 2.0 g kg<sup>-1</sup>, 有效磷 0.65 g kg<sup>-1</sup>, 全钾 23.8 g kg<sup>-1</sup>, 速效钾 2.5 g kg<sup>-1</sup>。

有机肥含水分 125.1 g kg<sup>-1</sup>, 有机质 451.6 g kg<sup>-1</sup>, N 18.8 g kg<sup>-1</sup>, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 11.5 g kg<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>O 19.3 g kg<sup>-1</sup>, 总养分 49.6 g kg<sup>-1</sup>, pH 6.0。

**1.1.3 培养基** (1) LB 培养基: 酵母浸膏 5.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 10.0 g, 加水定容至 1 000 ml, pH 7.0~7.2; (2) 无氮培养基: 蔗糖 10.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

<sup>†</sup> 通讯作者, E-mail: huangwy@njau.edu.cn

作者简介: 平泉瑞 (1984—), 男, 硕士, 主要研究方向为微生物生态。E-mail: hello-wind@163.com

收稿日期: 2012-02-12; 收到修改稿日期: 2012-05-30

0.5 g, CaCO<sub>3</sub> 1.0 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.2 g, 加水定容至 1 000 ml, pH 7.0 ~ 7.2; (3) 筛选和种子培养基: 加缩二脲于无氮培养基中, 含量为 0.5 mg ml<sup>-1</sup>, pH 7.0 ~ 7.2; (4) 0.4% 的水琼脂: 4 g 琼脂, 加水定容至 1 000 ml, pH 7.0 ~ 7.2。

**1.1.4 抗生素选择培养基** 将抗生素加入于 LB 培养基中制成。其中各种抗生素浓度分别为: 氨苄青霉素 (Amp) 为 100 μg ml<sup>-1</sup>, 四环素 (Tc) 为 5 μg ml<sup>-1</sup>, 壮观霉素 (Spe) 为 300 μg ml<sup>-1</sup>。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 标记菌株的构建** 采用三亲接合<sup>[10-15]</sup>, 将载体 pPZP201-gfp、辅助质粒 pRK2013 和目的菌株 GW-1 分别接入含相应抗生素的 LB 液体培养基中, 培养至对数生长期。取培养好的三种菌液 (供体菌, 辅助菌, 受体菌) 各 2 ml, 10 000 r min<sup>-1</sup> 离心, 用无菌水洗涤 3 次, 再用 LB 培养基洗涤 1 次。倾去上清液, 各加入 100 μl LB 培养基后将三种菌液混匀在一起, 将菌悬液涂于无菌滤膜上。滤膜置于不含抗生素的 LB 平板上, 于培养箱中 30℃ 培养 1 d。将滤膜上的菌体洗下, 稀释涂布于选择性平板上, 培养 1 d 后挑选转移接合子于含有相应抗生素的 LB 平板上, 30℃ 下培养过夜, 于紫外灯下检测荧光。或制作菌体水悬浮片, 于荧光显微镜下观察发光情况。

**1.2.2 *gfp* 质粒遗传稳定性试验<sup>[10-11]</sup>** 将 GW-1-GFP 菌株接种于含 300 μg ml<sup>-1</sup> 壮观霉素的 LB 平板上, 培养 1 d, 连续转接 10 次, 然后转接于 LB 培养基平板上, 培养 1 d, 再连续转接 40 次; 荧光显微镜观察菌体荧光或直接在紫外灯下检测平板, 以确定 *gfp* 基因是否能在 GW-1-GFP 菌株中稳定遗传。

### 1.2.3 GW-1、GW-1-GFP 菌株生长曲线的制作

分别将 GW-1、GW-1-GFP 接种于种子培养液中活化过夜, 然后按 5.0% 的接种量转移至 100 ml 的筛选培养液中, 每隔 0.5 h 取一次样, 测 24 h 之内的 OD<sub>600nm</sub> 变化情况。

**1.2.4 GW-1 菌株与转 *gfp* 基因的 GW-1-GFP 菌株的形态学特征比较** 将菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 分别划线接种于 LB 平板和含 300 μg ml<sup>-1</sup> 壮观霉素的 LB 平板上, 培养 2 d 后观察菌落形态、颜色, 并在光学显微镜下观察菌体形态。

**1.2.5 GW-1 菌株与转 *gfp* 基因的 GW-1-GFP 菌株的缩二脲降解能力比较** (1) 菌株缩二脲降解能力定性比较。将菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 分别划线接种于筛选培养基平板上, 培养 2 d 后分别观察菌

株 GW-1、GW-1-GFP 的生长状况, 初步确定其降解缩二脲的能力。(2) 菌株缩二脲降解能力定量测定。分别将菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 接种到至种子培养液中过夜活化, 以 5% 的接种量至装有 200 ml 筛选培养基的摇瓶中, 空白试验为相同处理的灭活菌, 28℃、160 r min<sup>-1</sup> 摇床培养, 分别于 12 h、35 h 时取样, 15 000 r min<sup>-1</sup> 离心 20 min 后, 取上清, 过已灭菌的孔径为 0.22 μm 的水系滤膜后, 适当稀释至 20 ~ 100 μg ml<sup>-1</sup> 范围内, 同时将缩二脲标准液也同样稀释至此范围, 以便确定缩二脲的保留时间, 然后进样于高效液相色谱仪 (HPLC) 进行分析, 定量测定 GW-1-GFP 菌株在摇瓶发酵中的缩二脲降解能力。

色谱条件见文献 [16-17], 作部分调整: Agilent 1200 型色谱仪, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq (规格 4.6 × 250 mm, 粒径 5 μm), 流动相为乙腈 + 水 = 10% + 90% (体积分数), 流速为 0.8 ml min<sup>-1</sup>, 柱温 25℃, 检测波长 195 nm, 进样量为 10 μl。

**1.2.6 GW-1-GFP 在土壤中的定殖情况和降解缩二脲能力的测定** (1) 菌悬液的制备。将标记菌株活化后, 按 5% 的接种量于含 100 mg L<sup>-1</sup> 壮观霉素的 LB 培养液中, 置于 28℃、160 r min<sup>-1</sup> 的摇床上培养至对数期, 经 7 000 r min<sup>-1</sup> 离心, 用 LB 洗涤菌体并重悬至所需浓度, 经平板计数为 6.5 × 10<sup>10</sup> CFU ml<sup>-1</sup>。(2) 土样的处理。菌悬液分别添加至风干的 200 g 土壤中并搅拌均匀, 使每克土壤中的含菌量控制在 8.13 × 10<sup>9</sup> CFU, 持水量保持在 25%, 每处理 3 个重复, 具体如下: ①空白: 不加缩二脲、不加缩二脲降解菌 GW-1-GFP; ②对照: 缩二脲 20mg kg<sup>-1</sup> 土壤 (未灭菌土) + 灭活 GW-1-GFP; ③处理 A: 缩二脲 20mg kg<sup>-1</sup> 土壤 (未灭菌土) + 1% 土壤干重的无菌发酵有机肥; ④处理 B: 缩二脲 20mg kg<sup>-1</sup> 土壤 (未灭菌土) + GW-1-GFP; ⑤处理 C: 缩二脲 20mg kg<sup>-1</sup> 土壤 (未灭菌土) + GW-1-GFP + 1% 土壤干重的无菌发酵有机肥; ⑥处理 D: 缩二脲 20mg kg<sup>-1</sup> 土壤 (灭菌土) + GW-1-GFP。(3) 标记菌株 GW-1-GFP 在土壤中的定殖情况。分别于 1 d、5 d、11 d、16 d、25 d、45 d 时取样, 稀释涂布于含 100 mg L<sup>-1</sup> 壮观霉素的 LB 培养基中, 28℃ 培养, 24 h 后在紫外灯下计数荧光菌落, 3 个重复。(4) 土壤中剩余缩二脲含量的测定。标记菌株在土壤中定殖 25 d 后, 直接将土样进行稀释, 28℃、160 r min<sup>-1</sup> 摇床培养过夜, 使缩二脲充分溶解, 取上清, 用孔径为 0.22 μm 的灭菌水系滤膜过滤后进样于高效液相色谱仪进行分析。

土壤中缩二脲含量测定的色谱条件: Agilent 1200 型色谱仪, 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq (规格  $4.6 \times 250$  mm, 粒径  $5 \mu\text{m}$ ), 流动相为 100% 的  $25 \text{ mmol L}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , 流速为  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , 柱温  $30^\circ\text{C}$ , 检测波长  $195 \text{ nm}$ , 进样量为  $20 \mu\text{l}$ 。

**1.2.7 GW-1-GFP 菌株在小麦根部的定殖和对小麦的促生作用** 小麦种子使用 0.1% 的  $\text{HgCl}$  进行表面消毒 10 min 后, 无菌水漂洗干净, 待用。在 0.4% 的水琼脂中加入缩二脲, 使得缩二脲的浓度分别为 0.01%、0.02%、0.04%、0.08%, 另设不加缩二脲的 0.4% 的水琼脂为对照。

菌株 GW-1、GW-1-GFP 分别在 LB 培养液中培养至对数期, 将已消毒的小麦种子分别浸泡于此两种菌液中 30 min, 取出种子晾干, 置于装有含不同浓度缩二脲 (0.01%、0.02%、0.04%、0.08%) 的 0.4% 水琼脂的培养瓶中, 每处理 3 个重复, 在光照培养箱中白天  $25^\circ\text{C}$  16 h、夜晚  $18^\circ\text{C}$  8 h, 培养 7 d 后, 在无菌条件下整株取出小麦苗, 将麦苗的根部放置于水琼脂平板上  $28^\circ\text{C}$  恒温培养 2 d, 然后在紫外灯下观察小麦根部 GW-1-GFP 菌株的定殖情况, 对照为相同处理的灭活菌。

### 1.3 数据处理和分析

应用 Olympus IX71 荧光显微镜观察标记菌株, 用 Excel、SPSS 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 标记菌株的构建

GW-1 菌株的抗性试验结果表明, GW-1 菌株对四环素、氨苄青霉素具有抗性, 结合三亲接合中所用载体和辅助质粒的抗性分析, 将加有氨苄青霉素、四环素和壮观霉素的 LB 培养基作为筛选结合子的培养基。载体 pPZP201-gfp、辅助质粒 pRK2013 和目的菌株 GW-1 通过三亲接合将 pPZP201-gfp 转入 GW-1 菌株, 获得标记菌株 GW-1-GFP。经紫外灯下观察形态、质粒提取、标记菌株的荧光检测, GW-1 菌株已获得荧光较强 *gfp* 基因标记质粒。荧光显微镜下标记菌株菌体照片 (见图 1)。

经观察, 菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 的菌落大小、形态特征基本一致, GW-1-GFP 菌株在紫外灯下发出绿光, 且在光学显微镜下观察两者菌体形态也无明显差别。在荧光显微镜下观察 (图 1), GW-1-GFP 菌体可以发出较强的绿色荧光, 表明 GW-1-GFP 菌株被标记成功。

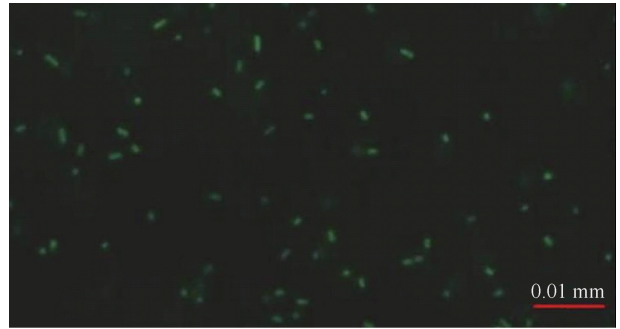


图 1 GW-1-GFP 菌株在荧光显微镜 ( $10 \times 100$ ) 下的菌体形态  
Fig. 1 Morphology of Strain GW-1-GFP under the fluorescence microscope ( $10 \times 100$ )

### 2.2 标记菌株的遗传稳定性

通过在抗性选择和无选择性的 LB 培养基上的转接试验, 发现壮观霉素抗性标记的保持率为 100%, 将共转接 20 次的平板置于紫外灯下观察, 发现菌落基本上均可发出明亮的绿色荧光, 说明重组质粒在受体菌中基本可以稳定遗传。

### 2.3 标记菌株的生长量测定

标记菌株 GW-1-GFP 与原始菌株 GW-1 菌株好氧培养 24 h 生长量测定如图 2 所示, 结果表明, 标记菌株 GW-1-GFP 与原始菌株相比在对应生长时间点的生长量相近, 说明含有外源质粒的标记菌株与原始菌株相比无生长负担。

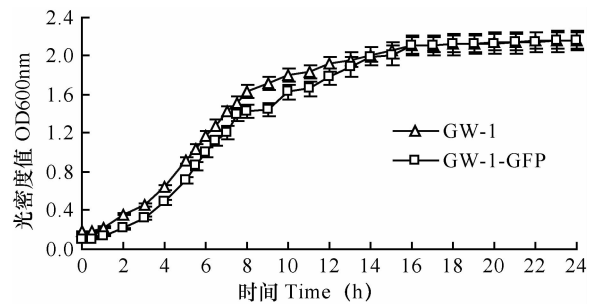


图 2 野生型菌株和标记菌株在好氧条件下的生长曲线  
Fig. 2 Growth curves of wild strain (GW-1) and tagged strain (GW-1-GFP) in the aerobic condition

### 2.4 GW-1 菌株与 *gfp* 基因标记的 GW-1-GFP 菌株的缩二脲降解能力比较

**2.4.1 菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 的菌落形态比较** 经观察发现, GW-1 和 GW-1-GFP 在筛选培养基上培养 2 d 时的菌落生长情况基本一致, 初步说明转化菌株在筛选培养基上的生长未受到影响。

**2.4.2 菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 降解缩二脲的 HPLC 分析** 图 3 为缩二脲标准液的 HPLC 图谱, 由图 3 可知, 缩二脲的保留时间约为 4 min。

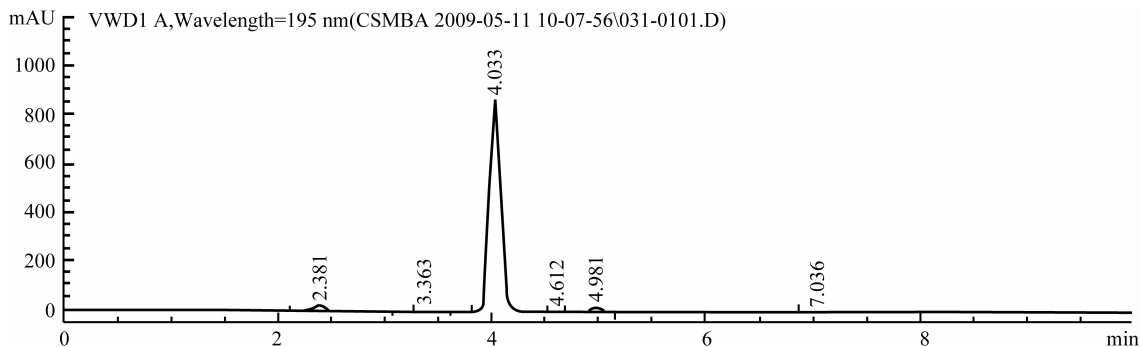


图3 缩二脲标准液色谱图

Fig. 3 Standard HPLC chromatogram of biuret

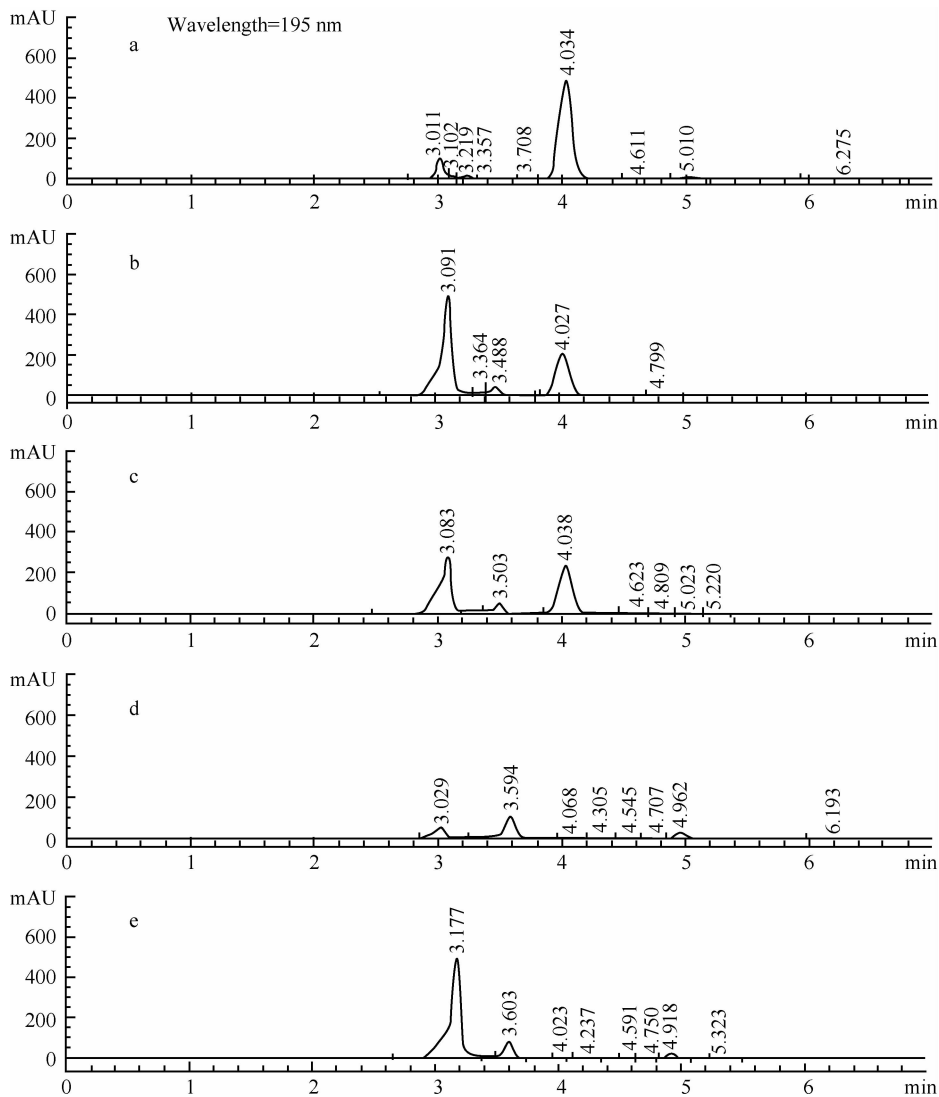


图4 不同处理发酵液中剩余缩二脲含量色谱图(图中 A:空白处理;B:GW-1 菌株培养 12 h 时;C:GW-1-GFP 菌株培养 12 h;D:GW-1 菌株培养 35 h 时;E:GW-1-GFP 培养 35 h 时)

Fig. 4 HPLC chromatogram of residual biuret in the zymotic fluids different in treatment (A: no GW-1 or GW-1-GFP; B: GW-1 cultivated for 12 hours; C: GW-1-GFP cultivated for 12 hours; D: GW-1 cultivated for 35 hours; E: GW-1-GFP cultivated for 35 hours)

缩二脲标样浓度在  $20 \sim 100 \mu\text{g ml}^{-1}$  之间与其相应的峰面积之间呈良好的线性关系,因而通过不同处理 HPLC 分析后缩二脲峰面积的比较(比较结果见表 1,图谱见图 4),可以定量地确定发酵液中缩二脲的降解率。由图 4 可知,与空白对比, GW-1

(12 h)、GW-1-GFP (12 h) 发酵液中缩二脲降解率分别为 56.34%、51.92%, GW-1 (35 h)、GW-1-GFP (35 h) 发酵液中缩二脲降解率分别为 99.56%、99.47%。说明转化菌株与原始菌株的缩二脲降解率相近,标记菌株的缩二脲降解能力没有降低。

表 1 GW-1 和 GW-1-GFP 在不同时间段发酵液中的剩余缩二脲的含量

Table 1 Contents of residual biuret in the zymotic fluids of strain GW-1 and GW-1-GFP at different times

发酵时间 Fermentation time (h)	峰面积 Peak area (mAU min)		
	空白处理 Blank	GW-1 处理 Treated with GW-1	GW-1-GFP 处理 Treated with GW-1-GFP
12	3 716 ± 10Aa	1 622 ± 95Bb	1 786 ± 89Cc
35	3 715 ± 98Aa	16.2 ± 2.7Bb	19.8 ± 3.2Cc

注:不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著 ( $p < 0.01$ ) Note: The different lowercase and uppercase letters show significantly difference at 0.05 and 0.01 levels, respectively

## 2.5 GW-1-GFP 在土壤中的定殖情况和降解缩二脲的能力

### 2.5.1 GW-1-GFP 菌株在土壤中的定殖情况

GW-1-GFP 在不同处理条件下在土壤中的定殖情况见图 5。GW-1-GFP 菌株从接种开始到 25 d 的时间内能够可以很好地在土壤中定殖,灭菌土壤(处理 D)在接种初期利于菌体的定殖,加入有机肥(处理 C)在一定程度上有利于 GW-1-GFP 菌株在土壤中的保持,25 d 后该菌株的种群数量下降 45% 以上,45 d 后菌株 GW-1-GFP 已经难以检测,可以认为该标记菌株是符合生态安全要求的。

2.5.2 GW-1-GFP 菌株于土壤中定殖 25 天时的缩二脲降解情况 由表 2 看出自然土壤中缩二脲含量较高,处理 B、C、D 中缩二脲含量分别较减少了 72.21%、68.46%、50.91%,说明 GW-1-GFP 在土壤中能够很好地降解缩二脲。

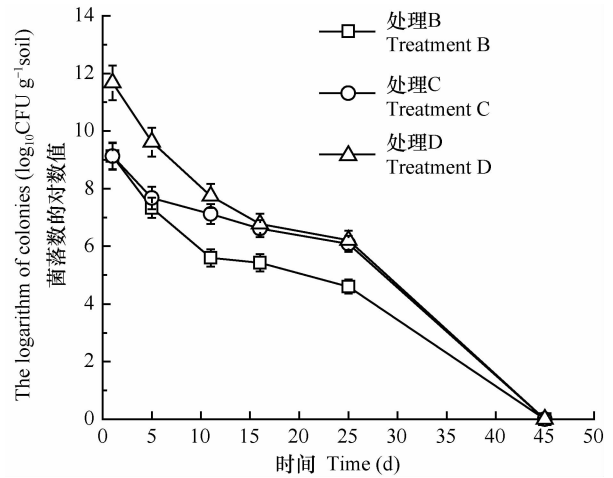


图 5 GW-1-GFP 在不同处理的土壤中的定殖情况

Fig. 5 Colonization of Strain GW-1-GFP in soil in different treatments

表 2 不同处理土样中缩二脲剩余量的峰面积比较

Table 2 The surplus contents of biuret in the soil under different treatments

发酵时间 Fermentation time (h)	峰面积 Peak area (mAU min)				
	空白 Blank	对照 Control	处理 B Treatment B	处理 C Treatment C	处理 D Treatment D
12	68.9	149.4	41.54	47.14	73.34

注:不同小写字母表示差异显著 ( $p < 0.05$ ),不同大写字母表示差异极显著 ( $p < 0.01$ ) Note: The different lowercase and uppercase show significantly difference at 0.05 and 0.01 respectively

## 2.6 GW-1-GFP 在小麦根部的定殖情况和对小麦的促生效果

将生长 7d 的小麦根部在 LB 平板上培养 2 d 后在紫外灯下观察,可见小麦的根部有绿色荧光发出

(图 6),说明 GW-1-GFP 菌株可以在小麦根部很好地定殖,并能随着根的延伸而生长,起到保护根部、扩大根土界面的作用,有力地证明该微生物菌剂与植物根部密切的生态关系。



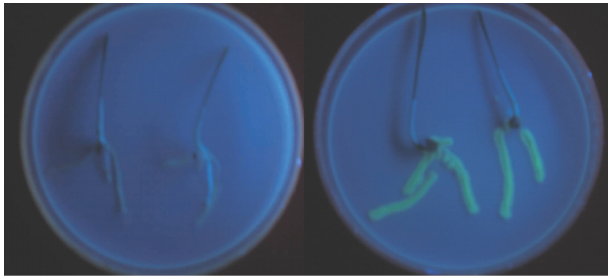


图 6 GW-1-GFP 菌株在小麦根部的定殖情况 (紫外灯下)

Fig. 6 The colonization condition of strain GW-1 and GW-1-GFP on the root of wheat (under the ultraviolet lamp)

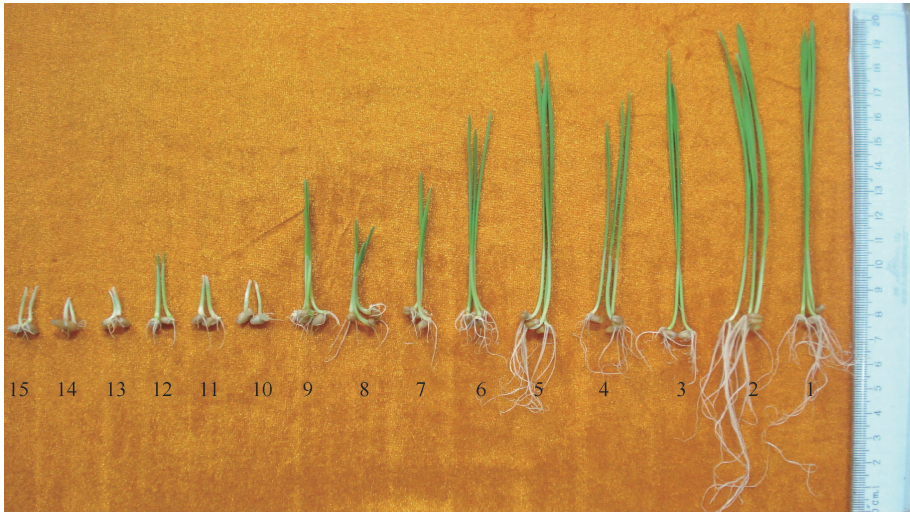


图 7 GW-1-GFP 和 GW-1 菌株对小麦生长的作用 (图中 1、4、7、10、13 为不使用菌悬液处理的小麦, 但缩二脲浓度依次为 0、0.01%、0.02%、0.04% 和 0.08%; 2、5、8、11、14 中小麦使用菌株 GW-1-GFP 的处理, 缩二脲浓度依次为 0、0.01%、0.02%、0.04% 和 0.08%; 3、6、9、12、15 中小麦使用菌株 GW-1 处理, 缩二脲浓度依次为 0、0.01%、0.02%、0.04% 和 0.08%)

Fig. 7 Effects of GW-1-GFP and GW-1 on growth of wheat (in the figure, Treatments 1, 4, 7, 10 and 13 used untreated wheat, but treated with 0, 0.01%, 0.02%, 0.04% and 0.08% biuret, respectively; Treatments 2, 5, 8, 11 and 14 used wheat inoculated with GW-1-GFP and the soil treated with 0, 0.01%, 0.02%, 0.04% and 0.08% biuret, respectively; Treatments 3, 6, 9, 12 and 15 used wheat inoculated with GW-1, and the soil treated with 0, 0.01%, 0.02%, 0.04% and 0.08% biuret, respectively)

### 3 讨论

通过三亲结合将含 *gfp* 基因的质粒转入到受体菌 GW-1 菌株中, 转化结合子的筛选是通过抗生素和 *gfp* 基因的双重标记, 因为结合子和供体菌 (*gfp* 质粒) 在紫外灯下均有绿色荧光发出, 所以在众多菌落中挑选出结合子就比较困难, 此时结合子和供体菌 (*gfp* 质粒) 的抗生素抗性就显得尤为重要。GW-1 菌株具有氨基青霉素抗性和四环素抗性, *gfp* 质粒具有壮观霉素抗性, 所以筛选结合子时选用的选择性培养基为加氨基青霉素、四环素和壮观霉素的 LB 培养基, 但 GW-1 菌株在含低于  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$

如图 7 所示, 在不加缩二脲的情况下, 加入菌株 GW-1-GFP 能促进小麦根际的生长, 在缩二脲浓度较低 (0.01%) 时, 标记菌株 GW-1-GFP 能有效缓解缩二脲对小麦的根系和地上部分的生长的抑制作用, 而菌株 GW-1 的作用不明显; 缩二脲浓度为 0.02% 时, 菌株 GW-1 和 GW-1-GFP 对小麦生长的作用不明显; 在缩二脲浓度较高 (0.04% 和 0.08%) 时, 其对小麦生长的抑制作用很大, 加菌株 GW-1 能在一定程度上缓解抑制作用但不明显, 而标记菌株 GW-1-GFP 的作用相对更小。

壮观霉素的 LB 平板上也可以生长, 就导致 GW-1 菌株在选择性培养基上也可以生长, 虽然其不会发出荧光, 但其与结合子混在一起, 为结合子的挑选带来了不便, 所以在高浓度壮观霉素的选择压力下筛选出了一批可以耐  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  壮观霉素的供体菌 (*gfp* 质粒), 用的选择性培养基中壮观霉素浓度为  $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ , 此时能在选择性培养基上生长的均为转移结合子。

标记菌株 GW-1-GFP 在作物根际和根部的定殖研究, 若直接使用荧光显微镜进行原位观察 GW-1-GFP 菌株时发现会受到植物组织和土壤自身荧光的干扰和物镜焦距的限制, 使得观察效果不佳。本试验中土壤和作物根际的定殖规律是通过取土样

稀释涂布平板获得。

而 GW-1-GFP 菌株在作物根部的定殖情况是在菌液中浸种后,使用水琼脂培养 7 d 后的小麦根部置于水琼脂平板上培养证明,清晰地证明该菌与小麦根部的亲和性,充分显示定殖部位的有效性和对根际的保护作用。该方法操作简便、直观,弥补了考察微生物菌剂有效性缺少直观检测方法的缺陷。

使用荧光标记的菌株 GW-1-GFP,在缩二脲浓度较低的情况下能很好地促进小麦根系的生长和苗的伸长,促生作用明显,而在缩二脲浓度较高时缓解缩二脲毒性的作用与出发菌株 GW-1 相比较差,可能是由于标记菌株包含外源基因,在缩二脲浓度高时生长势不如未标记菌株。

## 4 结 论

本研究通过三亲结合,获得了具绿色荧光标记的菌株 GW-1-GFP,在筛选平板上和筛选培养液摇瓶中的缩二脲降解试验证明了转化菌株 GW-1-GFP 降解缩二脲能力与原始菌株 GW-1 无明显差别,且标记菌株可经荧光检测进行观察。

通过抗生素抗性和 *gfp* 双重标记证明 GW-1-GFP 能够在土壤中很好地定殖,并具较好的降解缩二脲的功能,且该菌株符合土壤生态安全要求。

用 GW-1-GFP 菌株浸润的小麦种子在低浓度水琼脂中培养 7 d 后,经荧光观察显示该菌株与小麦根部有很好的亲和性,从而建立了检测、验证、追踪土壤中功能微生物菌剂与作物根部的亲和性和生态有效性的简易、直观的方法。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Mikkelsen R L. Biuret in urea fertiliser. *Fertiliser Research*, 1990, 26: 311—318
- [ 2 ] 魏作峰. 基于尿素低负荷生产时缩二脲的控制. *化肥设计*, 2007, 45(6): 27—28. Wei Z F. Control for biuret in production of urea with low load (In Chinese). *Chemical Fertilizer Design*, 2007, 45(6): 27—28
- [ 3 ] 蒋永忠, 何家骏, 吴金桂, 等. 缩二脲对冬小麦的毒害及解毒剂的应用. *江苏农业科学*, 1997(5): 49—50. Jiang Y Z, He J J, Wu J G, et al. The toxic action of biuret to winter wheat and the application of antidote (In Chinese). *Jiangsu Agricultural Sciences*. 1997(5): 49—50
- [ 4 ] Mikkelsen R L. Biuret in urea fertilizers. *Better Crops*, 2007, 91(3): 6—7
- [ 5 ] 平泉瑞, 邹凤珠, 黄为一. 复混肥中缩二脲含量对作物生长

的影响. *中国土壤与肥料*, 2009(6): 41—46. Ping Q R, Zou F Z, Huang W Y. Effect on the crops growth of biuret concentrations in the compound fertilizer (In Chinese). *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2009(6): 41—46

- [ 6 ] Wheldon G H, MacDonald R E. Utilization of biuret by *Pseudomonas aeruginosa*. *Nature*, 1962, 196: 596—597
- [ 7 ] Jenson H L, Koumaran K A. Microbiological transformation of biuret. *Annales Institut Pasteur Supplement*, 1965, 3: 184—190
- [ 8 ] Sahrawat K L. Mineralization of biuret nitrogen soil. *Plant and Soil*, 1981, 62: 469—471
- [ 9 ] El-Shahawy R M, Amer H A. Ammonification and nitrification of biuret in soils at different moisture levels. *Egypt Journal of Microbiology*, 1989, 24: 53—61
- [ 10 ] Leff L G, Leff A A. Use of green fluorescent protein to monitor survival of genetically engineered bacteria in aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(9): 3 486—3 488
- [ 11 ] 张昕, 张炳欣, 喻景权, 等. 生防菌 ZJY-1 及 ZJY-116 的 GFP 标记及其在黄瓜根围的生态适应性. *应用生态学报*, 2005, 16(11): 2 144—2 148. Zhang X, Zhang B X, Yu J Q, et al. Labeling of biocontrol agents ZJY-1 and ZJY-116 *gfp* gene and its ecological adaptability in cucumber rhizosphere (In Chinese). *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(11): 2 144—2 148
- [ 12 ] 张磊, 范丙全, 黄为一. 绿色荧光蛋白和潮霉素抗性双标记载体转化草酸青霉菌 P8 的研究. *微生物学报*, 2005, 45(6): 347—349. Zhang L, Fan B Q, Huang W Y. Study on transformation of P-dissolving *Penicillium oxalicum* P8 with double-marker vector expressing green fluorescent protein and hygromycin B resistance (In Chinese). *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(6): 347—349
- [ 13 ] 钟卫鸿, 叶海仁, 陈建孟, 等. 应用绿色荧光蛋白基因标记细菌进行生物膜结构定量新方法. *环境科学*, 2005, 26(4): 160—164. Zhong W H, Ye H R, Chen J M, et al. New method for spatial structure quantification of biofilm with GFP tagged bacteria (In Chinese). *Environmental Science*, 2005, 26(4): 160—164
- [ 14 ] 蔡天明, 管莉菠, 李顺鹏. *Pseudomonas putida* GM6 的 *gfp* 基因标记及在活性污泥中的定殖. *土壤学报*, 2007, 44(3): 516—521. Cai T M, Guan L B, Li S P. *gfp* gene-labeling and colonization of *Pseudomonas putida* GM6 in activated sludge (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2007, 44(3): 516—521
- [ 15 ] 殷幼平, 袁训娥, 李强, 等. 生防菌枯草芽孢杆菌 CQBS03 的绿色荧光蛋白基因标记及其在柑橘叶片上的定殖. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3 555—3 563. Yin Y P, Yuan X E, Li Q, et al. Construction of green fluorescent protein gene tagged biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* CQBS03 and its colonization on the citrus leaves (In Chinese). *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(17): 3 555—3 563
- [ 16 ] 石立军, 冯志敏. 反相高效液相色谱法测定尿素中缩二脲的含量. *宁夏石油化工*, 2005(1): 27—28. Shi L J, Feng Z M. Determination of the biuret content in urea by the reversed-phase HPLC (In Chinese). *Ningxia Petroleum and Chemical In-*

dustry, 2005 (1): 27—28

[17] 湛芳, 毛洪祥, 张淑娟, 等. 高效液相色谱法测定尿素中脲二胺. 磷肥与复肥, 2011, 26(2): 69—70. Chen F, Mao H X,

Zhang S J, et al. Determination of biuret in urea by HPLC (In Chinese). Phosphate & Compound Fertilizer, 2011, 26 (2): 69—70

## LABELING OF BIURET DEGRADING BACTERIA WITH *GFP* AND COLONIZATION OF THE BACTERIA IN CROP RHIZOSPHERE

Ping Quanrui Lu Yanna Huang Weiyi<sup>†</sup>

(*key Laboratory of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

**Abstract** Strains of biuret-degrading bacteria GW-1 were successfully isolated and labeled with green fluorescent protein with the triparental mating method and then the GFP-tagged strains were named GW-1-GFP. The expression of GFP in Strain GW-1-GFP was visualized under the fluorescent microscope and its dynamics was analyzed and stability tested. It was found that heterogenous plasmid did not bring any adverse effect to growth of the host strain GW-1-GFP and the strain was stable. HPLC analysis did not show any significant difference ( $p < 0.05$ ) between the origin stain GW-1 and the tagged strain GW-1-GFP in biuret-degrading ability. The tagged strain GW-1-GFP, proved by the antibiotics resistance screening and fluorescence tracing, could colonize well in the soil and was found to have degraded 50% of the biuret in soil in all the treatments on D25 after the application of Strain GW-1-GFP. It was also found in the experiment that the tagged strain was safe to the environment and vanished from the soil after 45 days. Good colonization of Strain GW-1-GFP in the rhizosphere of wheat seedlings which emerged from wheat seed inoculated with Strain GW-1-GFP was observed and the tagged strain could alleviate the toxic effects of biuret on wheat to a certain extent. The study provides a simple, intuitive method to trace functional microbial agents and corroborate their ecological effectiveness and affinity with crop roots in the soil.

**Key words** Biuret degradation; Microbial agents labeled with *gfp* gene; Colonization; Soil; Wheat rhizosphere