

## 抗 2,4-D 巨大芽孢杆菌基因组文库的构建

徐思靓<sup>1,2</sup>, 韩 潮<sup>1,2</sup>, 金龙国<sup>2</sup>, 邱丽娟<sup>2</sup>, 陶 波<sup>1</sup>

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/国家农作物基因资源与遗传改良重大科学工程/农业部作物种质资源与生物技术重点开放实验室, 北京 100081)

**摘要:**以抗 2,4-D 的巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* 为材料, 酶切基因组总 DNA 和载体 pACYC184; 回收 1~4 kb 范围的外源基因组 DNA 片段, 与载体连接后, 转入 BL21 感受态细胞中, 进行蓝白斑与氯霉素抗性筛选, 采用菌落 PCR 方法检测连接效率, 并对该文库进行质量鉴定。成功构建了巨大芽孢杆菌基因组文库, 得到 8 900 个阳性重组子, 平均插入片段长度为 2.5 kb, 文库约覆盖了 *B. megaterium* 菌株基因组的 556 倍。该文库的建立为选育抗 2,4-D 转基因大豆的新品种奠定了基础。

**关键词:** 抗 2,4-D; 巨大芽孢杆菌; 基因组文库; 转基因大豆

**中图分类号:** Q933 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0826

## Genomic Library Construction of *Bacillus Megaterium* Resistant to 2,4-D

XU Si-liang<sup>1,2</sup>, HAN Chao<sup>1,2</sup>, JIN Long-guo<sup>2</sup>, QIU Li-juan<sup>2</sup>, TAO Bo<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement (NFCRI)/Key Laboratory of Germplasm & Biotechnology (MOA), Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** *Bacillus megaterium* which was efficient resistant to 2,4-D, recycled the 1~4 kb DNA fragments of digested *B. megaterium* genomic DNA, and with digested vector pACYC184 overnight connection, transferred it to BL21 competent cells, after the blue-white screening and chloramphenicol resistance screening by colony PCR to detect the connection efficiency and quality of the library. Successfully constructed the *B. megaterium* genomic library and obtain 8 900 positive clones with an average insert fragment length of 2.5 kb. And this library covers approximately 556 times *B. megaterium* genome. This library establish the theoretical basis for 2,4-D resistant transgenic soybean.

**Key words:** 2,4-D resistant; *Bacillus megaterium*; Genomic library; Transgenic soybean

大豆是我国的主要作物之一, 在国民经济中占有重要地位<sup>[1]</sup>; 2,4-D 是农田施用的常见的植物生长调节剂, 低浓度能够显著加快植物生长、促发新根, 而高浓度对植物产生毒害作用, 抑制植物生长, 常用于喷施农田难防杂草<sup>[2]</sup>。但是由于大豆对 2,4-D 极为敏感, 且 2,4-D 易漂移扩散, 当扩散至大豆田中, 通过大豆的茎叶吸收, 可使其叶片萎蔫、黄化、枯死, 影响其光合吸收, 对大豆的生长发育产生不可逆的严重药害, 导致减产甚至绝产。近年来随着抗草甘膦基因 CP4 的诞生与推广<sup>[3]</sup>, 其他抗除草剂作物的研究受到了国内外学者的重视。由于 2,4-D 的漂移对于大豆产生的危害, 因而抗 2,4-D 大豆的培育迫在眉睫。研究抗 2,4-D 转基因大豆不仅能够长期继代增殖与保存, 而且对转基因育种具有重大意义。

本研究通过构建巨大芽孢杆菌基因组文库, 获得了菌株基因组内包含的重要信息, 为进一步了解该菌株的基因背景, 对除草剂抗性基因的筛选提供

了材料, 也为抗 2,4-D 转基因大豆的研究提供了具有参考价值的基因资源。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 从农药厂污水排放口的土壤中分离出一株耐受 2,4-D 浓度为 5 000 mg·L<sup>-1</sup> 的细菌, 经生理生化测定及 16 SrDNA 测序鉴定为巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)<sup>[4]</sup>, 由东北农业大学滕春红教授提供。

1.1.2 主要试剂 溶菌酶 (50 mg·mL<sup>-1</sup>)、细菌基因组 DNA 提取试剂盒、BL21 (DE) 感受态细胞。DNA Ladder 为天根试剂公司产品, 限制性内切酶 *Sau*3A I、*Bam*H I、*Cl*AP 酶 (牛小肠碱性磷酸酶)、*T*<sub>4</sub> Ligase、*ex*Taq 酶均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品, 质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒为博迈德生物公司产品, 其他常用生化试剂均为北京化学试剂有限公司产品。

收稿日期: 2014-03-06

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项 (2008ZX08004-001)。

第一作者简介: 徐思靓 (1989-), 女, 硕士, 主要从事除草剂抗性基因研究。E-mail: 15045116795@139.com。

通讯作者: 陶波 (1963-), 男, 教授, 博导, 主要从事农药应用技术及新型助剂研究与开发。E-mail: botaol@163.com。

## 1.2 方法

**1.2.1 细菌培养及基因组 DNA 的提取** 1 mL 菌株母液接种于 100 mL LB 液体培养基于 37℃ 过夜培养菌体,取 1 mL  $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 1 min,吸尽上清,加入终浓度为  $20\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的溶菌酶 180  $\mu\text{L}$ ,重悬菌液后,37℃ 水浴 45 min,加入  $10\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  的蛋白酶 K,结合天根细菌基因组 DNA 试剂盒中的试剂及说明书操作,在乙醇二次漂洗晾干后,用 ddH<sub>2</sub>O 溶解后洗脱,利用 ND-1000 紫外分光光度仪测量 DNA 的提取质量,同时用 1.0% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度后,保存于 -20℃。

**1.2.2 基因组 DNA 最佳酶切条件的确定** 为了提高酶切的效率,需预先进行酶切预试验,以确定最佳酶用量以及酶切时间。按照 *Sau3A* I: ddH<sub>2</sub>O 最终比例分别为 1:10、1:20、1:50、1:100、1:500 配制反应酶稀释液,酶切体系为:总 DNA 5.5  $\mu\text{L}$ , 10 × H Buffer 10  $\mu\text{L}$ ,反应酶稀释液 1  $\mu\text{L}$ ,加入 ddH<sub>2</sub>O 至 20  $\mu\text{L}$ ,并 37℃ 分别酶切 15、30、45、60、75、90 min 后,加入 10 × Loading Buffer 停止反应,用 1.0% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果,确定最佳消化条件。

**1.2.3 基因组 DNA 的部分酶切与回收** 按照确定的最佳条件,取 DNA 50  $\mu\text{L}$ ,按照 *Sau3A* I: ddH<sub>2</sub>O 为 1:50 的比例,酶切时间为 30 min,进行大量酶切,1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测部分酶切效果后,切胶回收 1~4 kb 长度范围的 DNA 片段。

**1.2.4 载体 DNA 的扩增** 参照 BL21 (DE3) 说明书操作:取 10  $\mu\text{L}$  环状载体 pACYC184 加入到 100  $\mu\text{L}$  感受态 BL21 (DE3) 细胞中轻轻转动混匀,混合物冰浴 30 min 后,放入 42℃ 恒温水浴锅中热激 90 s,取出后不要摇动,立即放入冰水混合物中冰浴 5 min,向其加入 LB 培养液 900  $\mu\text{L}$ ,37℃ 摇床  $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 50 min,取 100  $\mu\text{L}$  涂布于含有氯霉素 (Cm) 的 LB 平板上,37℃ 培养过夜,挑取克隆子于 15 mL LB 培养液中,37℃ 摇床  $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 8 h,离心收集菌体提取质粒后,用 0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测载体扩增结果。

**1.2.5 载体 DNA 的酶切与去磷酸化** 酶切体系为 *Bam*H I 内切酶 5  $\mu\text{L}$ ,pACYC184 载体 5  $\mu\text{g}$ ,10 × K Buffer 10  $\mu\text{L}$ ,加入 ddH<sub>2</sub>O 补充体系至 100  $\mu\text{L}$ ,37℃ 酶切 2 h 后,加入 10 × Loading Buffer 停止反应,0.8% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测载体酶切的质量,切胶回收约 4.2 kb 的片段。

将上述消化后的载体 DNA 50  $\mu\text{L}$ ,加 2  $\mu\text{L}$  CIAP (牛小肠碱性磷酸酶),用 ddH<sub>2</sub>O 稀释混合物至终体积 100  $\mu\text{L}$  (此时 CIAP 终浓度  $0.1\sim 0.5\text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ),37℃ 温育 1 h,加 3  $\mu\text{L}$   $0.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA,68℃ 温育 10 min,利用 100  $\mu\text{L}$   $50\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH8.0) 饱和苯酚/氯仿抽提 DNA 1 次;转移

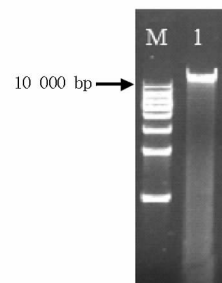
上清液,再用等体积氯仿抽提 1 次,将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管中,加入 1/10 体积的  $3\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  醋酸钠 (pH5.2) 和 2.5 倍体积无水乙醇用于沉淀 DNA,4℃  $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清,加 500  $\mu\text{L}$  70% 乙醇,轻轻颠倒数次 4℃  $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min,倒置离心管,在空气中干燥 DNA 沉淀物,在用 20  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O 重悬 DNA,取 2  $\mu\text{L}$  进行 1.0% (w/v) 琼脂糖凝胶电泳检测,其余用于连接反应使用。

**1.2.6 连接及转化** 将已去磷酸化的载体 DNA 1.0  $\mu\text{L}$  与酶切回收的基因组 DNA 以体积比 1:3 混合,加 *T*<sub>4</sub> Ligase 至终浓度 0.25  $\mu\text{L}$ ,*T*<sub>4</sub> Ligase buffer 5  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 补体系至 10  $\mu\text{L}$ ,16℃ 连接过夜,取 10  $\mu\text{L}$  连接产物加到 100  $\mu\text{L}$  BL21 (DE3) 中,操作同 1.2.4,37℃ 摇床  $120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  振荡培养 50 min,涂布于含有 Cm ( $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )、X-gal ( $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 IPTG ( $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的 LB 平板上,37℃ 培养 10 h,置于 4℃ 0.5 h 充分显色后,挑取 10 个白色菌落,用 pACYC184 载体通用引物:184Cm1F (5'-CACCGTG-TATGAAATCTAACAATGCG-3')/184Cm1R (5'-AG-CAGCCCAGTAGTAGGTTGAG-3') 进行菌落 PCR,反应条件为 94℃ 3 min;94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 50 s,共 30 个循环;72℃ 10 min 延伸,用 1.0% (w/v) 的琼脂糖凝胶电泳检测连接效果。

## 2 结果与分析

### 2.1 巨大芽孢杆菌基因组的 DNA 纯度

利用紫外分光光度计检测基因组 DNA 样品,结果为  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.88$ ,  $A_{260}/A_{280} = 2.12$ ,电泳检测其分子质量在 10 kb 以上 (图 1),表明提取的 DNA 纯度较高,没有蛋白及其他污染,得到的总 DNA 达到了构建基因组文库构建的要求。



M:1 kb plus DNA Ladder;1:巨大芽孢杆菌基因组 DNA。

M:1 kb plus DNA Ladder;1:DNA of *Bacillus megaterium*。

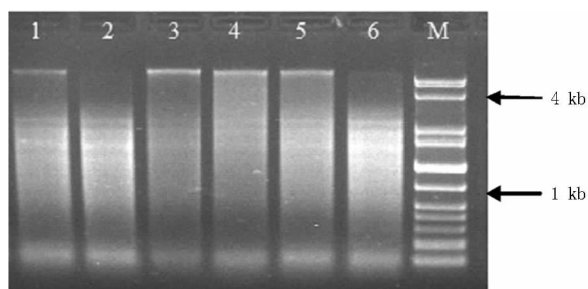
图 1 巨大芽孢杆菌基因组 DNA

Fig.1 The DNA of *Bacillus megaterium*

### 2.2 基因组 DNA 酶切条件的确定及回收结果

如图 2 中第二条泳道结果所示,该条件下 DNA 片段大小集中于 1~4 kb,且质量较好。由于抗除草剂基因片段大小多为 900~4 000 bp,故此泳道酶切充分且片段大小适宜、效果最好,故采用该条件 (酶

稀释浓度 1:50, 酶切时间 30 min) 下大量酶切后, 胶回收 1~4 kb 片段。

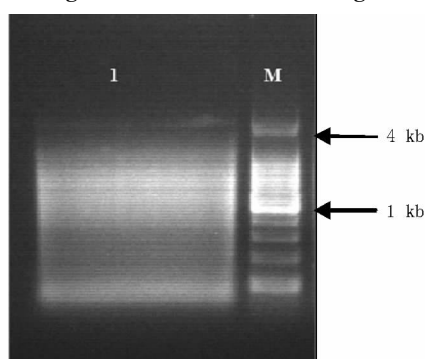


1~6: *Sau3A* I 稀释浓度为 1:50, 反应时间 15, 30, 45, 60, 75, 90 min; M: Marker (1 kb)。

1-6: *Sau3A* I diluted by 50 times, reaction time: 15, 30, 45, 60, 75, 90 min; M: Marker (1 kb)。

图 2 DNA 酶切结果

Fig. 2 The results of DNA digestion



1: 稀释 50 倍的 *Sau3A* I 部分酶切 DNA 30 min; M: 1 kb plus DNA Ladder。

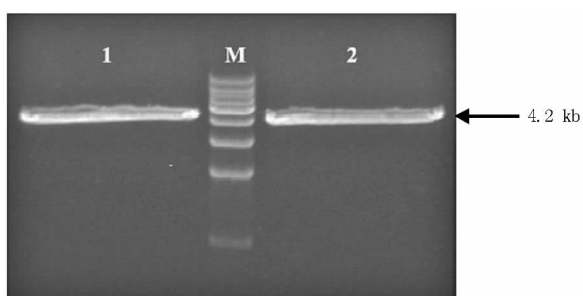
1: The results of DNA digested after 30 min by *Sau3A* I with 50 times dilution; M: 1 kb plus DNA Ladder。

图 3 DNA 大量酶切结果

Fig. 3 The results of DNA digestion

### 2.3 载体酶切与去磷酸化的结果

克隆扩增的 pACYC184 载体, 质粒提取检测与原载体大小相同, 经过 *Bam*H I 酶切后, 条带大小较切前略为减小, 约为 4 200 bp, 说明酶切较好 (图 4)。通过 CIAP 去磷化与纯化处理, 电泳检测结果



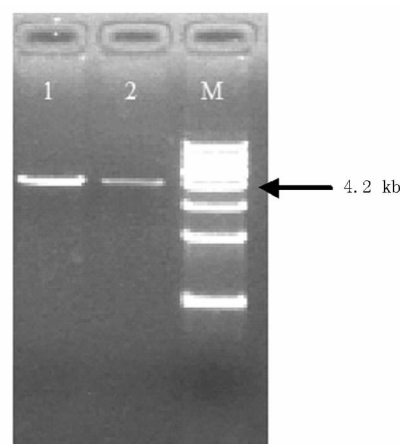
1: pACYC184 载体; 2: *Bam*H I 酶切后的载体; M: 1 kb DNA Ladder。

1: pACYC184 vector; 2: The vector digested by *Bam*H I; M: 1 kb DNA Ladder。

图 4 *Bam*H I 酶切载体

Fig. 4 The digested vector by *Bam*H I

表明载体浓度略微下降, 片段大小与线性载体相同 (图 5)。



1: 经过去磷酸化后载体; 2: 经过纯化后的载体; M: 1 kb DNA Ladder。

1: The vector after dephosphorylation; 2: the vector after purification; M: 1 kb DNA Ladder。

图 5 载体的去磷酸化与纯化

Fig. 5 Dephosphorylation and purification of vector

### 2.4 阳性克隆的结果

应用 pACYC184 载体通用引物 (184Cm1F/R) 进行菌落 PCR, 电泳结果显示含有重组 DNA 片段的阳性 10 个克隆子均含有插入片段, 插入片段大小分布在 1~4 kb, 平均大小约为 2.5 kb (图 6)。



M: Marker (1 kb); 1~10: 部分阳性克隆子 PCR 结果。

M: Marker (1 kb); 1-10: Parts of the results of PCR and plasmids of positive strain。

图 6 阳性菌株 PCR 结果

Fig. 6 The results of PCR and plasmids of positive strain

### 2.5 基因组文库的构建

根据公式  $N = \ln(1-P)/\ln[1-(1/G)]$  (其中  $N$  为转化子数,  $P$  为获得目的基因可能性, 一般为 99%,  $I$  为克隆片段的平均大小,  $G$  为基因组大小) 计算出: 由于巨大芽孢杆菌基因组大小  $G = 4 \times 10^6$  bp, 获得目的基因的可性  $I = 99\%$  时, 平均插入片段约  $P = 2.5$  kb, 计算出所需的基因文库的克隆数量为 2 630 ~ 18 400 个, 计算出共计获得阳性克隆大约 8 900 个, 此文库覆盖了约 2 225 Mb 的基因组序列, 按照巨大芽孢杆菌菌株基因组 4 Mb 的大小估算, 此文库约覆盖了巨大芽孢杆菌基因组的 556 倍。综合原始文库滴度与扩增库容以及覆盖率可以鉴定 T-1 基因组文

库质量较好,符合要求。

### 3 讨 论

近年来国内外对于抗 2,4-D 的基因研究较为深入,1987 年 Wolfgang 首先从细菌 JMP134 中克隆出具有降解 2,4-D 的 *tfdA* 基因,并且表达了该基因<sup>[5]</sup>,获得了抗 2,4-D 的转基因棉花<sup>[6]</sup>。研究表明能够降解 2,4-D 的微生物有多种,已分离到的菌株分别属于  $\alpha$ -、 $\beta$ -、 $\gamma$ -型变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌/绿菌门(*Bacteroidetes/Chlorobi*),这些细菌含有 *tfdA* 或 *tfdA $\alpha$*  基因,基于进化和系统发育树被分为 3 个类别(class)<sup>[7]</sup>;Class I 包括无色杆菌属(*Achromobacter*)、产碱菌属(*Alcaligenes*)、克霍尔德氏菌属(*Burkholderia*)、贪铜菌属(*Cupriavidus*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、红育菌属(*Rhodoferrax*)、多噬菌属(*Variovorax*)等;Class II 包含在生长较慢的贫营养型  $\alpha$ -变形菌门中,与慢生根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)紧密相关,通常分离于未经 2,4-D 处理的原始环境中<sup>[8]</sup>;Class III 第 3 群也含有 *tfdA $\alpha$*  基因,由  $\alpha$ -变形菌门中的氨醇单胞菌属(*Sphingomonas* spp.)组成<sup>[9]</sup>,但本研究的供试菌株并不属于以上菌属,其对于 2,4-D 的抗性研究也未见报道。

根据近年来的研究,已证实从海洋中分离的巨大芽孢杆菌可以显著抑制黄曲霉的生长,并抑制黄曲霉毒素合成基因的表达<sup>[10]</sup>;同时另有研究表明该细菌对重金属吸附能力较强<sup>[11]</sup>;并且降低水中的亚硝酸含量<sup>[12]</sup>;尤其对磷有较强的吸附与分解能力,通过该菌的代谢活动,可以对磷进行吸收与转化,减少环境中磷的富集量<sup>[13-14]</sup>。由于巨大芽孢杆菌对大自然中危害人类的物质能够有效的降解与吸附,因此在治理环境污染方面也具有有良好的应用前景。

综上所述,通过构建巨大芽孢杆菌基因组文库获得抗 2,4-D 新基因是一条切实可行的途径,希望通过 2,4-D 的浓度筛选,获得一个拥有我国自主产权的新基因,并转入到大豆中,培育出有效地耐受高浓度 2,4-D 的大豆新品种。

### 参考文献

[1] 李文霞,李柏云,薛红,等. 黑龙江省不同生态区大豆品种育种性状的主要成分分析[J]. 大豆科学,2013,32(6):731-734. (Li W X, Li B Y, Xue H, et al. Principal components analysis of breeding traits in various ecological regions in Heilongjiang province[J]. Soybean Science, 2013, 32(6):73-76.)

[2] 王红梅,刘正德,刘芳,等. 转基因抗 2,4-D 棉花室内快速鉴定方法初探[J]. 中国农业科学,1999,32(2):112. (Wang H M, Liu Z D, Liu F, et al. Preliminary study on simple methods for i-

dentifying 2,4-D resistant transgenic cotton plants in laboratory [J]. Scientia Agricultura Sinica, 1999, 32(2):112.)

[3] 孙克. 从选择性除草剂市场恢复情况分析草甘膦抗性杂草的发展[J]. 农药,2012,51(4):235-237,253. (Sun K. Analysis of glyphosate resistant weeds development from selective herbicides market recovery[J]. Agrochemicals, 2012, 51(4):235-237,253.)

[4] 滕春红,刘永双,李相全,等. 2,4-D 丁酯抗性细菌巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的分离和鉴定[J]. 作物杂志,2013(1):117-120. (Teng C H, Liu Y S, Li X Q, et al. Isolation and identification of a 2,4-D butylester-resistant bacteria *Bacillus megaterium*[J]. Crops, 2013(1):117-120.)

[5] Wolfgang R, Kenneth N, Meinhart H. Analysis, cloning, and high-level expression of 2,4-Dichlorophenoxyacetate monooxygenase gene *tfdA* of *Alcaligenes eutrophus* JMP134[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(7):2950-2955.

[6] 陈志贤, Danny J, Llewellyn, 等. 利用农杆菌介导法转移 *tfdA* 基因获得可遗传的抗 2,4-D 棉株[J]. 中国农业科学, 1994, 27(2):31-37. (Chen Z X, Danny J, Llewellyn, et al. 2,4-D resistant transgenic cotton plants produced by *Agrobacterium*-mediated gene transfer[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1994, 27(2):31-37.)

[7] Kamagata Y, Fulthorpe R, Tamura K, et al. Pristine environments harbor a new group of oligotrophic 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-degrading bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(6):2266-2272.

[8] Itoh K, Kanda R, Momoda Y, et al. Presence of 2,4-D-Catabolizing bacteria in a Japanese arable soil that belong to BANA (*Bradyrhizobium*-*Agromonas*-*Nitrobacter*-*Afipia*) cluster in  $\alpha$ -proteobacteria [J]. Microbes and Environments, 2000, 15(2):113-117.

[9] Itoh K, Tashiro Y, Uobe K, et al. Root nodule *Bradyrhizobium* spp. harbor *tfdA*  $\alpha$  and *cadA*, homologous with genes encoding 2,4-D ichlorophenoxyacetic acid-degrading proteins[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(4):2110-2118.

[10] 孔青,刘奇正,耿娟,等. 海洋巨大芽孢杆菌抑制黄曲霉毒素的生物合成[J]. 食品工业科技,2010,31(8):132-134. (Kong Q, Liu Q Z, Geng J, et al. Inhibitory effect on the aflatoxin biosynthesis by a strain of marine *Bacillus megaterium* [J]. Science and Technology of Food Industry, 2010, 31(8):132-134.)

[11] 刘月英,付锦坤,陈平,等. 巨大芽孢杆菌 D01 吸附金( $\text{Au}^{3+}$ )的研究[J]. 微生物学报,2000,40(4):425-429. (Liu Y Y, Fu J K, Chen P, et al. Studies on biosorption of  $\text{Au}^{3+}$  by *Bacillus megaterium*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2000, 40(4):425-429.)

[12] 杨艳,刘萍,马鹏飞,等. 巨大芽孢杆菌 MPF-906 对养鱼水质净化的初步研究[J]. 水产养殖,2007,28(3):6-8. (Yang Y, Liu P, Ma P F, et al. Research on the role of *B. megaterium* MPF-906 in purifying water quality of fish cultivating [J]. Journal of Aquaculture, 2007, 28(3):6-8.)

[13] 郑传进,黄林,龚明,等. 巨大芽孢杆菌解磷能力的研究[J]. 江西农业大学学报(自然科学版),2002,24(2):190-192. (Zheng C J, Huang L, Gong M, et al. A study on the capacity of *Bacillus megaterium* in dissolving P compounds[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2002, 24(2):190-192.)

[14] 陈凯,李纪顺,杨合同,等. 巨大芽孢杆菌 P1 的解磷效果与发酵条件研究[J]. 中国土壤与肥料,2010(4):73-76. (Chen K, Li J S, Yang H T, et al. Phosphate solubilizing abilities of *Bacillus megaterium* strain P1 and its fermentation conditions[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2010(4):73-76.)