

土壤中解钾菌 K02 的筛选、鉴定及培养条件优化

吴红艳, 于 森, 冯 健, 王智学, 冯 敏

(辽宁省微生物科学研究院, 辽宁 朝阳 122000)

摘 要 解钾微生物是能够在土壤或纯培养条件下, 将含钾矿物如长石、云母等不能被作物吸收利用的矿物态钾分解, 并产生水溶性钾的微生物。利用以钾长石粉为唯一钾源的硅酸盐细菌选择性培养基, 采用梯度稀释分离法平板划线对番茄土壤中的钾细菌进行筛选。利用原子吸收火焰分光光度法测定钾细菌培养液中可溶性钾的含量, 筛选高效解钾菌株。通过形态观察和 16S rDNA 序列 GenBank 比对, 同时利用 clustalx 和 MEGA 4.0 等相关软件构建系统进化树对解钾能力最强的菌株 K02 进行鉴定, 初步鉴定该解钾菌为胶质类芽胞杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*); 利用单因素试验法对 K02 菌株培养基组分及发酵条件进行优化, 初步确定菌株 K02 最佳培养基组分以解钾复筛培养基为基础, 其碳源、氮源及无机盐以可溶性淀粉 1%、酵母膏 0.2%、 K_2HPO_4 0.05% 为最佳; 菌株 K02 最佳发酵条件: 培养温度为 30 °C, 培养时间为 48 h, 培养基装量为 50 mL/250 mL, 培养基初始 pH 值为 7.5, 接种量为 5%, 这一结果为解钾菌肥的研制和生产提供参考。

关键词 解钾菌; 鉴定; 培养条件; 优化; 钾长石粉

中图分类号 Q939.96

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2020)04-0060-06

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2020.04.009

Screening, Identification and Culture Condition Optimization of Potassium-Soluble Bacteria K02 in Soil

WU Hong-yan, YU Miao, FENG Jian, WANG Zhi-xue, FENG Min

(Liaoning Acad. of Microbiol., Chaoyang 122000)

Abstract Potassium-soluble microbes are those that can decompose potassium-bearing minerals such as feldspar, mica etc, which cannot be absorbed and used by crops, into water-soluble potassium in soil or under pure culture conditions. Potassium bacteria from tomato soil were screened using gradient dilution separating method on plate scratching method with potassium feldspar powder as the only potassium source in silicate bacteria selective medium. The content of soluble potassium in the solution of culture medium of potassium bacteria was determined by atomic absorption flame spectrophotometry to screen high-effective potassium-soluble strain. Through morphological observation and Gen Bank comparison of 16S rDNA sequence, at the same time phylogenetic tree was constructed using clustalx and MEGA 4.0 and other related software to identify the strain K02 with the strongest potassium resolution ability, which was initially identified as *Paenibacillus mucilaginosus*. Single factor testing method was used to initially optimize the fermentation conditions of K02 strain. It was initially confirmed that the optimal medium composition of K02 was based on potassium rescreening medium, and the carbon source, nitrogen source and inorganic salts were soluble starch 1%, yeast extract 0.2% and K_2HPO_4 0.05%; The optimal fermentation conditions of K02 were initially determined as follows: the culture temperature was at 30 °C, the culture time was 48 h, the medium loading volume was 50 mL/250 mL, the initial pH was 7.5, and the inoculation volume was 5%. This result provided a theoretical basis for the development and production of potassium soluble bacterial fertilizer.

Keywords potassium bacteria; identification; culture conditions; optimization; potassium feldspar powder

基金项目: 辽宁省科学事业公益基金项目(20180045); 中央引导地方科技创新项目(2019JH6/10200004)

作者简介: 吴红艳 女, 研究员。主要从事农业微生物研究。E-mail: lnwuhy@163.com

收稿日期: 2020-07-20

钾是农作物生长过程中必需的三种大量营养元素之一,可促进作物生长发育,促进植物光合作用,提高二氧化碳的同化率,促进其产物的运输;钾对酶具有活化作用,从多方面对氮素和有机酸代谢产生影响^[1]。此外,钾还具有多种抗逆功能,包括增强作物抗旱、抗高温、抗寒、抗病、抗盐、抗倒等功能,对作物稳产、高产有明显地促进作用。因此,钾元素被大量加工成钾肥应用于农业生产^[2]。土壤中的钾从其对作物的有效性来衡量,可分为难溶性钾、缓效性钾和速效性钾。难溶性钾主要以矿态存在,占土壤全钾量的 90% 以上,由于矿态物质很难被风化,所以作物难以利用,需要长期风化,转变为有效钾被作物利用^[3];缓效性钾主要存在于粘土矿物晶层、黑云母和次生矿物水云母中^[3-4],仅占土壤全钾量的 2%,可很缓慢地补充土壤中的速效性钾;速效性钾包括土壤胶体上的代换性钾和水溶性钾,这类钾易于作物吸收,但数量很少,仅占土壤全部钾的 1%~2%。虽然土壤中钾含量看似很高,实际可为作物吸收利用的数量却很少^[5],使便于利用的钾资源匮乏,且分布极不均匀^[6],成为限制农作物产量提高和品质改善的重要因素,因此,筛选新的高效解钾菌,使自然界中的钾能够更好的被利用迫在眉睫。本研究利用钾长石粉能够有效促进植株对钾等营养物质吸收利用的特点^[7],以混合了一定浓度钾长石粉的实验室盆栽番茄土壤作为试验材料,分离筛选解钾细菌,测试有效菌株培养液中可溶性钾的含量,研究了其解钾能力,并对优势菌株 K02 进行了鉴定,同时利用单因素试验对高效解钾菌 K02 培养条件进行了优化,旨在为解钾菌菌肥研制生产提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验材料 ①钾长石粉处理:钾长石粉过 180 目筛,去离子水浸泡过夜后,再用去离子水充分洗涤 3~5 次,以去除其中的可溶性钾,阴干备用^[8]。②土壤样品采集:取蔬菜大棚的土壤作为实验室盆栽土壤,因番茄在实验室栽培过程中管理方便,病虫害较轻,所以选用番茄作为解钾细菌

的筛选植株。按土壤量的 0.2% 加入处理好的钾长石粉,然后移栽番茄幼苗生长 30 d 后,将整个盆内秧苗地上土壤及根际所附着的全部土壤混合均匀,即为土壤样品。

1.1.2 培养基(g/L) ①初筛培养基^[10]:亚历山大罗夫培养基:蔗糖 5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, Na_2HPO_4 2.0, CaCO_3 0.1, FeCl_3 0.05, 钾长石粉 1.0, 琼脂 1.8, 去离子水 1.0 L, pH 7.4。②种子培养基:蔗糖 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, K_2HPO_4 2.0, CaCO_3 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, NaCl 0.1, 酵母膏 0.5, pH 7.4, 去离子水 1.0 L。③解钾复筛培养基:蔗糖 10, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCO_3 1.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, NaCl 0.1, 酵母膏 0.5, Na_2HPO_4 2.0, 钾长石粉 10, pH 7.4, 去离子水 1.0 L。

1.1.3 试剂与仪器 KCl 标准溶液为原子吸收专用标准溶液,钾长石粉、 NaH_2PO_4 、 FeCl_3 、蔗糖、 CaCO_3 均为国产分析纯。普析 A3 原子吸收分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司),雷磁 PHS-3C pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司),SPX-450 生化培养箱(中仪国科北京科技有限公司),HZQ-Q 全温振荡器(中国哈尔滨东联电子技术有限公司)。

1.2 方 法

1.2.1 解钾细菌的初步分离纯化及菌落形态观察^[11] 将采集的土壤样品混合均匀,称取 5 g 置于 45 mL 无菌玻璃珠水中 30 ℃ 振荡 30 min,采用梯度稀释法将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 三个浓度的土壤溶液平板划线涂布于初筛培养基固体平板上,30 ℃ 培养 72 h,观察菌落生长情况。

1.2.2 解钾菌的复筛(培养液中水溶性钾含量测试^[12]) 挑取初筛培养基平板上圆形、透明、有弹性的单菌落接种于种子培养基中,30 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h,将种子培养液按 5% 接种量接种于 50 mL/250 mL 解钾复筛液体培养基中,30 ℃ 振荡培养 48 h,培养液 9 000 r/min 离心,取上清液,每个实验设置 3 个重复,利用原子吸收火焰分光光度计检测培养液中可溶性钾的含量,记录测试结果。

1.2.3 解钾菌 K02 的 16S rDNA 鉴定 序列测定由宝生物工程(大连)有限公司完成,测序结果在

NCBI 上进行 BLAST 比对,分析同源性,将同源性较高的菌株序列利用 clustalx 和 MEGA 4.0 等软件构建系统进化树,进行菌株的初步鉴定。

1.2.4 解钾菌 K02 培养基组分的优化^[13] ①在解钾菌复筛培养基的基础上,分别加入葡萄糖、蔗糖、果糖、可溶性淀粉、甘露醇作为培养基的碳源,加入量均为 1.0%。②在解钾菌复筛培养基的基础上,分别加入蛋白胨、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、酵母膏、尿素作为培养基的氮源,加入量均为 0.2%。③在解钾菌复筛培养基的基础上,分别加入 MgSO_4 、 NaCl 、 K_2HPO_4 、 MgCl_2 、 Na_2HPO_4 作为培养基的无机盐,加入量均为 0.05%。④最佳碳源、氮源、无机盐的浓度优化:将上述各最佳成分设置为不同浓度,碳源浓度分别设置为 0.5%、1.0%、1.5%;氮源浓度分别为 0.1%、0.2%、0.3%;无机盐浓度分别为 0.01%、0.05%、0.1%。50 mL/250

mL 三角瓶接种量为 5%, 30 ℃、200 r/min 振荡培养 48 h,测定培养液 OD_{600} 光密度值并分析实验结果。

1.2.5 解钾菌 K02 培养条件的优化 选用 1.2.4 优化后的培养基,设置不同的培养温度、培养时间、培养基装量、起始 pH、接种量五个因素(以 OD_{600} 测定作为检测手段)进行单因素优化试验,并对结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 解钾菌株分离纯化试验

土壤中的细菌经过初筛、复筛和纯化,挑取 35 株基本特征为菌落凸起,透明或乳白色,表面光滑,有弹性,玻璃珠状,具有较大透明圈的菌落进行后续试验,解钾菌株分离纯化试验结果见图 1。

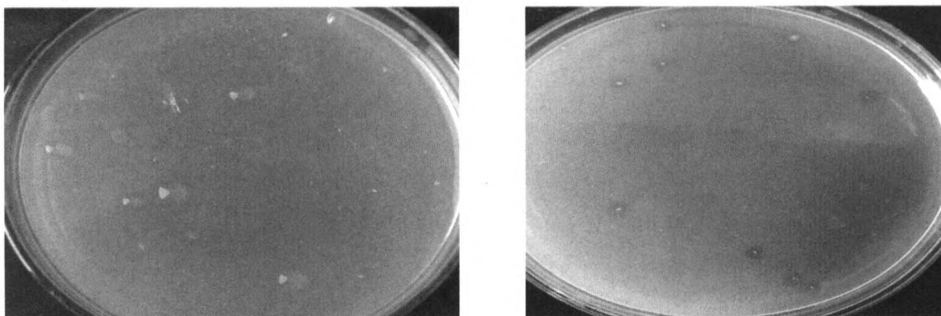


图 1 解钾菌株分离纯化菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of isolation and purification of potassium-releasing strain

2.2 解钾菌株复筛及解钾能力测试

从 35 株菌培养液中测得的可溶性钾含量结果可以看出,有 10 株菌株可溶性钾含量较高,其中菌株 K02 含量最高为 41.84 mg/L,对其进行分子鉴定及后续试验研究。解钾菌株复筛及解钾能力测试结果见图 2。

2.3 解钾菌的 16S rDNA 鉴定结果与分析

对所测序列在 NCBI GenBank 中进行 BLAST 比对,并利用相关 clustalx 和 MEGA 4.0 等软件构建系统进化树,对结果进行分析,菌株 K02 与胶质芽胞杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*) 部分序列同源性达到 100%,由图 3 可以看出,菌株 K02 的 16S rDNA 序列与胶质类芽胞杆菌同

源性最高,系统进化树亲缘关系最近,结合菌落特征初步鉴定为胶质类芽胞杆菌。

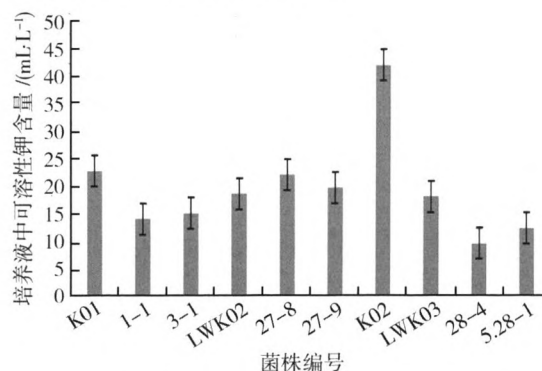


图 2 菌株解钾能力测试结果

Fig. 2 Test results of potassium solution ability of strain

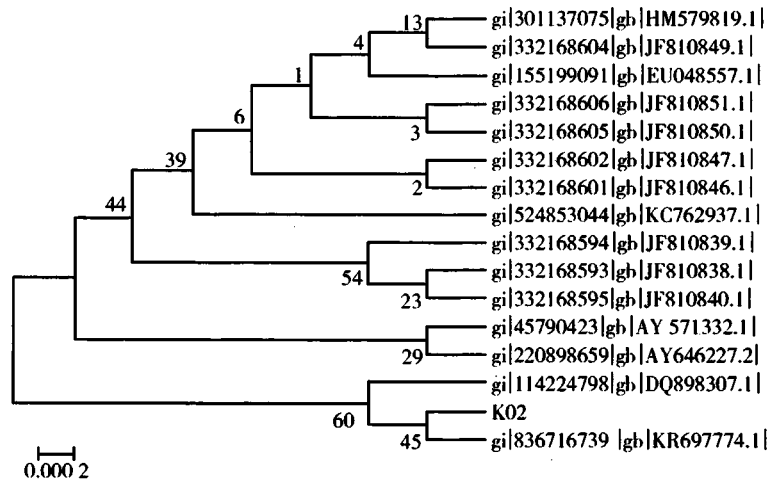


图 3 菌株 K02 系统进化树

Fig. 3 Strain K02 phylogenetic tree

2.4 解钾菌 K02 培养基组分的优化

由图 4 可以看出,经过比较分析,5 种碳源中可溶性淀粉 OD_{600} 光密度值最高,说明菌液浓度最高,菌株 K02 生长最好,通过对可溶性淀粉不同浓度的实验分析,可溶性淀粉浓度为 1% 时, OD_{600} 光密度值最高,菌株 K02 生长最好。

由图 5 可以看出,通过对 5 种不同氮源比较分析,氮源为酵母膏时菌株 K02 生长情况最好,酵母膏浓度为 0.2% 时,菌株 K02 生长最好。

由图 6 可以看出,通过对不同浓度无机盐对菌株 K02 生长情况影响的分析, K_2HPO_4 浓度为 0.05% 时,菌株 K02 生长最好。

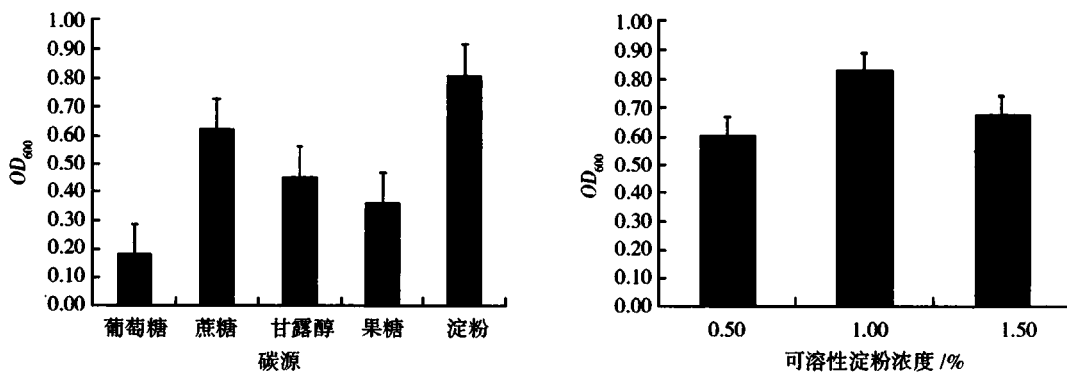


图 4 不同碳源及可溶性淀粉对菌株 K02 生长的影响

Fig. 4 The effects of different carbon sources and soluble starch on the growth of strain K02

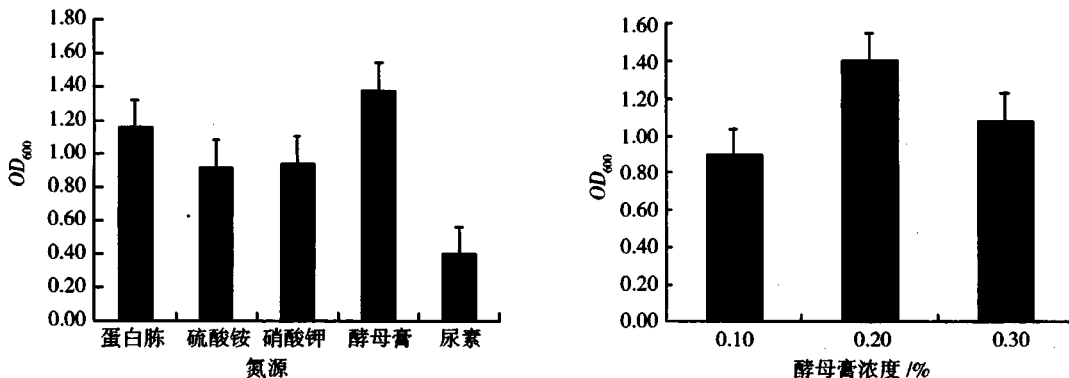


图 5 不同氮源及酵母膏对菌株 K02 生长的影响

Fig. 5 The effects of different nitrogen sources and yeast cream on the growth of strain K02

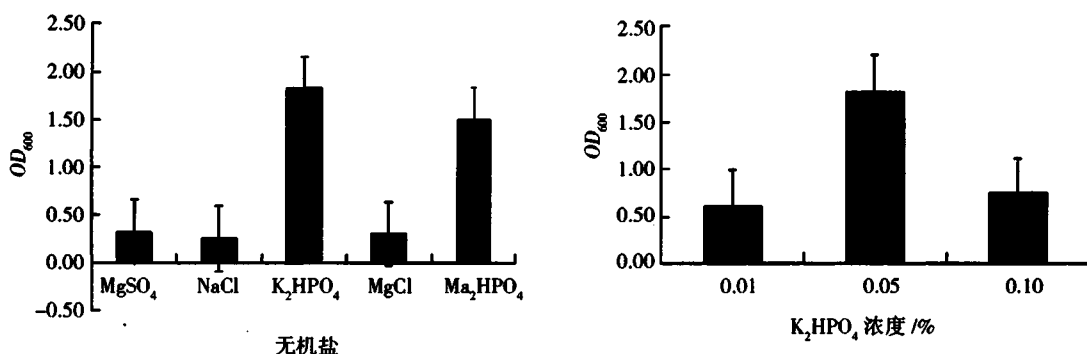


图6 不同无机盐及 K₂HPO₄ 对菌株 K02 生长的影响

Fig. 6 Effects of different inorganic salts and dipotassium phosphate on the growth of strain K02

通过对解钾菌 K02 培养基组分进行单因素优化,结果表明,以解钾菌复筛培养基为基础,碳源浓度为 1% 的可溶性淀粉、氮源浓度为 0.2% 的酵母膏、无机盐浓度为 0.05% 的 K₂HPO₄ 组成最佳培养基配方。

2.5 解钾菌 K02 培养条件的初步优化

由图 7 可以看出,利用单因素试验对解钾菌 K02 培养条件进行初步优化,优化后的发酵条件为培养温度 30 ℃、培养时间 48 h、培养基装量 50 mL/250 mL,初始 pH 值 7.5,接菌量 5%。

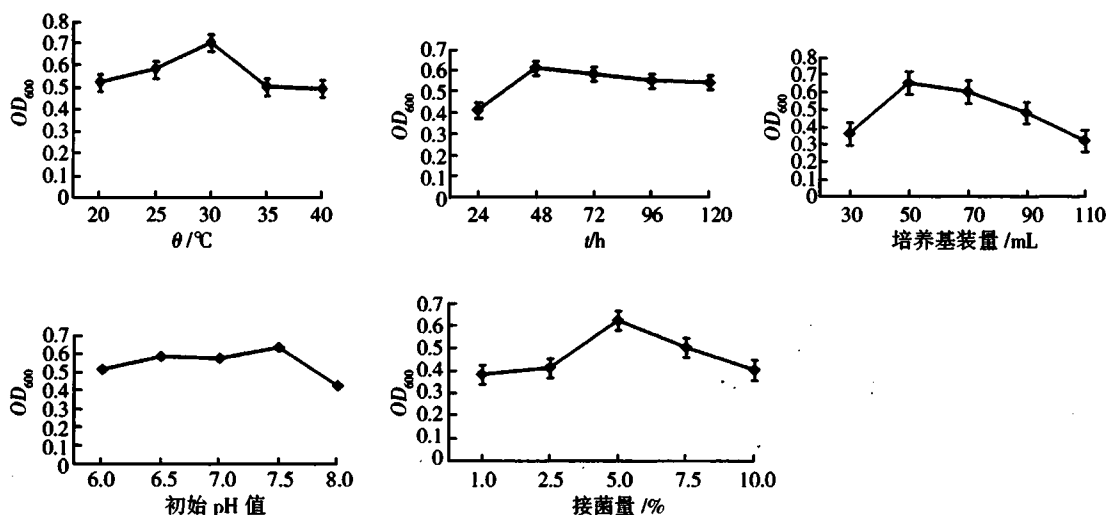


图7 不同培养条件对解钾菌 K02 生长的影响

Fig. 7 Effects of different culture conditions on the growth of phosphorus-releasing bacterium K02

3 讨论

通过对解钾菌 K02 的解钾能力进行测试,发酵液中可溶性钾含量高达 41.84 mg/L,作为目的菌株进行测序与 NCBI 中 GenBank 进行 BLAST 比对,同时利用 clustalx 和 MEGA 4.0 等相关软件构建系统进化树,并对结果进行分析。结果表明,菌株 K02 与胶质类芽胞杆菌 (*Paenibacillus mucilaginosus*) 同源性达到 100%,且系统进化树显示亲缘

关系最近。通过对菌株 K02 解钾菌培养基成分及培养条件单因素优化试验研究,菌株 K02 最佳培养基组分以解钾复筛培养基为基础,其碳源、氮源及无机盐以可溶性淀粉 1%、酵母膏 0.2%、K₂HPO₄ 0.05% 为最佳,最佳发酵条件为培养温度 30 ℃、培养时间 48 h、培养基装量 50 mL/250 mL,初始 pH 值 7.5,接菌量 5%。说明菌株 K02 在生长过程中能够更好地利用无机氮和多糖,碳

源浓度过低,会使菌株缺少足够的能量,过高浓度的碳源和无机盐提高了培养基的渗透压,不利于微生物生长。

实验室土壤和自然条件下的土壤成分有很大的不同,也存在很多可变因素,因此,对菌株 K02 还需进一步研究才能应用于生产实践,同时还要结合合理的施用方法以及针对作物不同种类、不同生育期对钾的不同需求量进行研究应用^[14]。将含解钾菌的微生物肥料与其他肥料(如氮肥)联合施用,可提高氮的代谢作用,氮素不仅促进作物的生长,而且可增强作物对钾的吸收和利用^[15],使用更加安全、有效,能最大限度的发挥其稳产、增产的作用。

参考文献:

- [1] 任丽丽,李玉玺,陈阳,等. 硅酸盐细菌解钾作用研究进展[J]. 实验科学与技术,2015,13(2):209-211.
- [2] 汤鹏,胡佳频,易浪波,等. 钾长石矿区土壤解钾菌的分离与多样性[J]. 中国微生态学杂志,2015,27(2):125-129.
- [3] 张梦旭,杨少峰,曾凡海,等. 钾细菌的解钾机制及在烟草生产上的应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2017,46(4):373-378.
- [4] 郝蓓蓓,叶建仁. 高效钾细菌的筛选鉴定及对植物的促生长效应[J]. 河南农业科学,2020,49(2):81-88.
- [5] 闫小娟,李振轮,谢德体,等. 钾细菌对钾长石胶体吸附特性的影响研究[J]. 西南大学学报(自然科学版),2017,39(2):1-7.
- [6] 葛红莲,季秀娥. 黄瓜根际解钾细菌的分离筛选、鉴定及其促生效果[J]. 北方园艺,2017,13:21-25.
- [7] 谭康,吴泽英,顾永丽,等. 一株高效解钾菌的筛选[J]. 六盘水师范学院学报,2018,30(3):52-55.
- [8] 韩晓阳,周波,董玉惠,等. 山东茶园土壤高活性解钾细菌筛选鉴定及肥效研究[J]. 茶叶科学,2018,38(1):78-86.
- [9] 中国科学院南京土壤研究所微生物室. 土壤微生物研究方法[M]. 北京:科学出版社,1985.
- [10] 王海德. 溶磷解钾菌株的筛选及培养基优化[D]. 济南:山东农业大学,2018.
- [11] 宋凤鸣,刘建华,史正军,等. 解磷解钾根际促生菌的分离鉴定和筛选应用[J]. 广东农业科学,2017,3:94-100.
- [12] 孙金凤,翟景琳,钱坤,等. 解钾菌的分离筛选及其解钾能力测定[J]. 淮阴工学院学报,2017,26(5):52-56.
- [13] 李新新,高新新,陈星,等. 一株高效解钾菌的筛选、鉴定及发酵条件的优化[J]. 土壤学报,2014,51(2):381-388.
- [14] 张爱民,李乃康,赵钢勇,等. 土壤中解磷、解钾微生物研究进展[J]. 河北大学学报(自然科学版),2015,35(4):442-447.
- [15] 王金昌,郑国华,傅筱冲,等. 一株解钾解磷菌株的筛选[J]. 江西科学,2014,32(1):51-53.

欢迎订阅《微生物学杂志》