

解钾微生物 K3 与 K4 的分离及特性研究

曲忠诚, 孙冬梅, 迟 莉

(黑龙江省农业科学院齐齐哈尔分院, 黑龙江齐齐哈尔 161041)

摘要: 用无氮培养基从土壤 中选出 2 株菌种, 然后对菌种进行分离、鉴定以及对解钾能力进行测定。结果表明: 对不同地区及生物肥料样品进行稀释倒皿后, 只有少数样品中分离到解钾菌株。该菌通过革兰氏染色实验、过氧化氢酶实验、硝酸盐还原实验、淀粉水解实验和 V. P. 实验等初步鉴定为芽孢杆菌。该菌解钾效果随时间的延长菌浓度逐渐增加但 pH 变化不明显。

关键词: 解钾菌; 硅酸盐细菌

中图分类号: S144 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0017-03

Study on Separation and Characterization for K Microbial K3 and K4

QU Zhong-cheng, SUN Dong-mei, CHI Li

(Qiqihar Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar, Heilongjiang 161041)

Abstract: Two bacteria were elected from soil by no-nitrogen medium, and then the bacteria were isolated, identified and determined their ability to solution of potassium. The results showed: after dilute the samples of different regions and biological fertilizer, there were only a few samples could separate the strains of potassium. The results of Gram staining and catalase experiment, nitrate reduction test, starch hydrolysis experiments V. P. tests indicated negative. Preliminary experiments identified as Bacillus. Pathogen potassium effect with the extension of bacteria concentration gradually increased, but did not change the pH.

Key words: K bacteria; portland bacteria

中国钾肥资源少, 靠大量进口才能满足农业生产的需要。长期大量使用氮肥和普遍采用高产品种, 加剧了土壤有效钾元素的消耗, 导致农田土壤缺钾的矛盾越来越突出^[1], 而且会使土壤结构的破坏和植物病害日趋严重。另外化肥的大量流失将造成生态环境的破坏, 化肥在农产品中的残留, 既降低了农产品品质, 又危害人体健康, 从而产生令人担忧的社会问题^[2,3]。

微生物肥料种类繁多, 按照微生物的作用机制可分为根瘤菌肥料、自生固氮肥料、解磷细菌肥料、解钾细菌肥料、抗生素肥料和复合微生物肥料^[4]。目前, 在生物肥料上广泛应用的菌种主要是硅酸盐细菌, 第一次从土壤中分离出硅酸盐细菌的是前苏联学者亚历山大罗夫^[5], 他发现该细菌能分解硅酸盐类矿物如正长石和磷灰石释放出钾、磷、硅酸盐细菌, 一般认为属环状胶质芽孢杆菌, 也有认为属邻单胞菌属^[6], 硅酸盐细

菌是一种化能异养菌, 能利用葡萄糖、淀粉碳源, 也能在无氮培养基上生长^[7,8]。

土壤中的钾元素大多数以硅酸盐矿物形式存在于土壤中不易被植物吸收利用, 解钾细菌多是硅酸盐细菌, 它能分解硅酸盐类矿物并释放出钾等元素供植物利用, 将土壤中无效钾元素转化为有效态钾, 同时也有固氮、解磷功能。

钾细菌肥施入土壤后, 除了为作物提供速效性钾、磷、硅等营养元素外, 还具有促使土壤结晶构造破坏的作用, 从而有利于农作物的营养吸收^[9]。解钾细菌作为生物菌肥正得到越来越多的应用, 降低成本, 采用来源更广泛的原材料生产钾细菌对其推广应用有着积极的意义。

能够使土壤中矿物态钾转化为有效形态的细菌, 目前发现的主要有扭脱芽孢杆菌 (*Bacillus extorquens*), 胶质芽孢杆菌 (*B. mucilginosns*), 环状芽孢杆菌 (*B. circulans*)^[10] 等。本文对从大庆地区土壤中筛选到 2 株硅酸盐细菌进行了分离、菌种鉴定以及对土壤解钾能力进行了研究。

收稿日期: 2009-06-25

基金项目: 齐齐哈尔农业攻关项目 (NG06-06)

第一作者简介: 曲忠诚(1980-), 男, 黑龙江省人, 学士, 研究实习员, 主要从事植物保护研究。E-mail: qzc777@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料 采自大庆地区不同地方的土壤,用小铲子除去表土,取5~10 cm深处的土样若干及市面购买的几种生物肥料。

1.1.2 实验仪器 恒温培养箱、小型快速离心机、分光光度计、恒温水浴锅、超净工作台(均属于黑龙江八一农垦大学生命科学技术学院生物技术实验室),试剂盒(购于南京建成生物工程研究所)。

1.1.3 培养基配方 分离培养基/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$:改良阿须贝无氮培养基;菌株特性测定的培养基。(1)可溶性淀粉琼脂培养基:牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 可溶性淀粉 2 g, 琼脂 18 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.2~7.4。先将可溶性淀粉在少量蒸馏水中微热溶解,然后再加入其它成分,调 pH, 于 121.3℃灭菌 25 min。(2)葡萄糖蛋白胨液体培养基:蛋白胨 5 g, 葡萄糖 5 g, K_2HPO_4 2 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0~7.2 于 121.3℃灭菌 25 min。(3)硝酸盐牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, KNO_3 1 g, NaCl 5 g, H_2O 1 000 mL, pH 7.0~7.6 于 121.3℃灭菌 25 min。(4)石蕊牛奶培养基:2.5%石蕊液 40 mL, 脱脂奶粉 100 g, H_2O 1 000 mL。将石蕊浸泡在蒸馏水中过夜或更长的时间,使石蕊变软而易于溶解,必要时可再用研钵磨碎,过滤,取上清液,并补足失去的水分,即为石蕊液。分装试管,于 112℃灭菌 30 min。(5)测定初始生长 pH 培养基:葡萄糖 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, NaCl 0.2 g, CaSO_4 0.1 g, K_2HPO_4 0.2 g, 酵母粉 10 g, H_2O 1 000 mL, 调 pH 分别为 4, 5, 6, 7, 8 和 10, 于 121.3℃灭菌 25 min。(6)柠檬酸盐利用培养基:NaCl 5 g, Na_2HPO_4 1 g, 柠檬酸钠 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1 g, 1%溴百里酚蓝水溶液 10 mL, 琼脂 20 g, H_2O 990 mL。加热溶解各组分,调 pH = 7.0, 加入指示剂,分装试管,121.3℃灭菌 20 min, 搁置斜面。(7)牛奶培养基:脱脂奶粉 5 g, 蒸馏水 50 mL, 112℃灭菌 20 min, 琼脂 1.5 g, 蒸馏水 50 mL, 121.3℃灭菌 20 min, 待分开灭菌的两液冷却到 45~50℃时,混匀倒平板。

1.2 方法

1.2.1 试剂的配制 (1)1%盐酸对氨基二甲基苯胺水溶液:将氨基二甲基苯胺盐酸盐 1 g 溶于 100 mL 蒸馏水中,于棕色瓶中 4℃保存。(2)卢哥尔氏(Lugol)碘液:碘片 1 g, 碘化钾 2 g, 蒸馏水 300 mL, 先用少量(3~5 mL)蒸馏水溶解碘化钾,再投入碘片,待碘全部溶解后,加入水稀释至 300 mL。放置于棕色瓶中保存数月,也可先配成 100 mL 母液,使用时加两倍水稀释。(3)甲基红试剂:甲基红 0.1 g, 95%乙醇 300 mL, 蒸馏水 200 mL。(4)1%溴百里酚兰:先用少量 95%的乙醇溶

解后再加水配成 1%浓度。(5)格理斯氏(Griess)试剂: A 液:对氨基苯磺酸 0.5 g, 10%稀醋酸 150 mL; B 液: α -萘胺 0.1 g, 10%稀醋酸 150 mL, 蒸馏水 204 mL。(6)二苯胺试剂:二苯胺 0.5 g 溶于 100 mL 浓硫酸中,用 20 mL 蒸馏水稀释。

1.2.2 菌种的分离 在无菌操作下称取 5 g 土样,溶于 45 mL 无菌水,充分振荡并稀释后涂布于已制好的分离培养基的平板上。倒放于 28~30℃恒温箱中培养 3~5 d,用接种针挑起透明凸起富有弹性的菌落进一步分离、纯化。

1.2.3 菌种的鉴定 革兰氏染色实验:菌液涂片后干燥并固定,结晶紫染色 1 min 后水洗再用碘液媒染。用乙醇脱色后再用蕃红液复染,吸干后镜检,观察细胞颜色。

过氧化氢酶实验:将待测细菌接种于斜面培养基,28℃恒温培养 24 h。检测用接种环取一小环菌种涂抹于已滴 5%过氧化氢的玻璃片上,如有气泡产生为阳性,无气泡则为阴性。

硝酸盐还原实验:挑取纯培养物接种于硝酸盐胨水培养基中,置 37℃恒温箱内培养 2 d 观察结果。在硝酸盐胨水培养基内的小倒管气体产生者,即为产气试验阳性,表明该菌可以利用硝酸盐并将亚硝酸分解产生氮气,否则为阴性。

淀粉水解实验:准备好淀粉培养基平板,接种环取少量的待测细菌点接在培养基表面,接种后的平皿置于 37℃恒温箱中培养 48 h 平板。滴加少量的碘液于平板上,轻轻旋转使碘液均匀铺满整个平板。菌落周围如出现无色圈,则说明淀粉已经被水解,表示该细菌具淀粉的能力为阳性,菌落周围不出现无色则为阴性。

V. P. 实验:接种该菌于装有葡萄糖蛋白胨培养液的试管中,置于 37℃恒温培养 24 h。取出试管,在培养基中加入 40%的 KOH 溶液 20 滴,再加入等量的 α -萘酚振荡,再放入 37℃恒温箱中 15~30 min,观察颜色变化。

在不同的 pH 及盐浓度下,有菌落的生长即为该菌株可以在此条件下存活。

1.2.4 细菌解钾实验方法 钾长石来自黑龙江八一农垦大学植物科技学院,称取 5 g,磨细为钾长石矿粉,将矿粉加入 150 mL 锥形瓶中,添加发酵培养基 90 mL,灭菌后另加 10 mL 菌液。置于振荡器中振荡,振荡速度为 160 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。每隔一天定时测量微生物的解钾能力及培养基的 pH 变化与菌液的浓度,为了消除实验操作中可能产生的误差,每组实验都在同样的条件下进行。

1.2.5 钾离子的测定方法 有效钾速测操作步骤(四苯硼酸钠法):(1)发酵上清液制备:将发酵液过滤离心

后获得;(2)操作步骤:参考表 1;(3)结果计算:土壤有效钾含量(氧化钾/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)=读数 $\times 5$ 。

表 1 发酵液解钾能力测定参考

顺序	材料	位	标准色阶					
			5	10	15	20	30	40
1	含 $\text{K}_2\text{O}_4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 标准液		1	2	3	4	6	8
2	蒸馏水		7	6	5	4	2	0
3	发酵上清液		0	0	0	0	0	0
4	3% EDTA 甲醛液		1	1	1	1	1	1
5	摇匀		摇匀	摇匀	摇匀	摇匀	摇匀	摇匀
6	3% 四苯硼酸钠		1	1	1	1	1	1
7	摇匀		摇匀	摇匀	摇匀	摇匀	摇匀	摇匀
8	总体积		10	10	10	10	10	10
9	比浊		5 ~ 20 min 内比浊读数					

2 结论与讨论

2.1 菌株的分离筛选

对采集的土样采用常规系列稀释法分离,多次划线分离后在分离培养基的平板上可观察到圆形、凸起、透明、粘稠的菌落,培养 3 ~ 5 d 后菌落直径约为 6 ~ 9 mm。由于多数的解钾菌在具有解钾能力的同时也具有固氮能力,所以在菌株选择上,我们以产荚膜能力的大小作为一个筛选条件。对不同地区及生物肥料样品进行稀释倒皿后,只有少数样品中分离到了解钾的菌株,其中以生物肥料样品 2 号获得的菌株较多,为 4 个,其他均较少,有的样品中没有解钾微生物的出现(见表 2)。

表 2 不同土壤样品中解钾微生物的数量

样品号	出现的菌落数	具有荚膜菌落的个数
1	3	0
2	8	4
3	4	2
4	2	0
5	7	3
6	2	0
7	10	2

2.2 菌种鉴定结果

对获得的产生荚膜菌落较多的 2 号样品和 5 号样品进行菌种纯化、鉴定,获得菌株 K3 和 K4(见表 3)。

该两株菌革兰氏染色均呈阳性,过氧化氢酶呈阳性,淀粉水解呈阳性,硝酸盐还原呈阳性,V. P. 反应呈阴性,该两株菌对温度和盐离子浓度的适应能力不是很强,在温度为 4℃和盐浓度达到 2.1%时几乎菌落不形成。在牛肉膏、蛋白胨培养基上菌落特征圆形、凸起、透明、粘稠。初步鉴定该两株细菌为芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)(见表 3,图 1)。

表 3 不同解钾菌的菌落及菌株特性

菌株	菌落形态	菌体形态	革兰氏染色	芽孢	颜色	透明度
K3	圆形、凸起	短杆菌	阳性	有、居中	乳白色	透明
K4	圆形、凸起	杆菌	阳性	有、偏端	乳白色	半透明

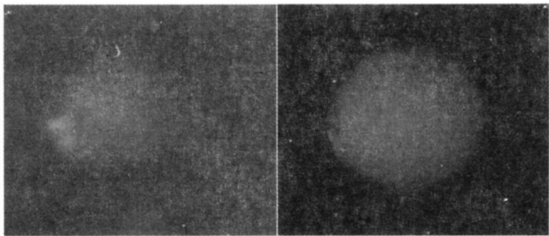


图 1 解钾菌的菌落

2.3 细菌解钾效果

将从土壤获得的两菌株用发酵培养基培养 7 d,每株菌 3 次重复,以不加菌为对照,每天定时测量菌体的浓度与解钾能力。试验结果表明,随着培养时间的延长,两株解钾菌的菌浓度逐渐增高,而 pH 变化却不明显,但是培养基中可溶性钾的浓度变化却随着时间的延长而逐渐增加,这可能与代谢过程中有可溶性钾的释放有关,而与他人提出的 pH 会降低不相符,具体原因还有待进一步深入研究(见图 2,图 3)。

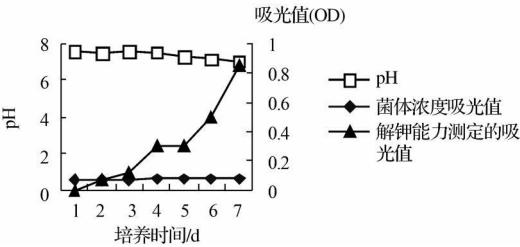


图 2 K3 菌株解钾能力测定结果

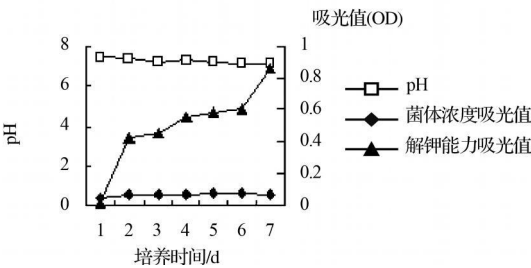


图 3 K4 菌株解钾能力测定结果

3 结论

本工作对土壤中分离出硅酸盐细菌并对细菌进行鉴定以及对该菌对钾长石的解钾能力做了初步研究。通过分离筛选,有少部分菌株具有解钾能力,通过菌种鉴定,初步认为该菌为芽孢杆菌。对解钾效果进行测定,随时间的延长,2 株菌浓度逐渐增加,pH 变化不明显,培养基中可溶性钾浓度变化逐渐增加,这可能与代谢过程中释放可溶性钾有关。

参考文献:

[1] 邓晓 廖晓兰,黄璜. 农药与土壤微生物相互作用的研究进展[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2002,28(增刊):120-124.
[2] 张永利,陈爱华,王丽华,等. 微生物与化肥复合颗粒肥料的开发前景[J]. 中氮肥,2001(6):6-8.

肾蕨离体培养技术的研究

司 亮

(黑龙江省农业科学院园艺分院, 黑龙江哈尔滨 150069)

摘要:以肾蕨匍匐茎茎尖为外植体, 对离体再生培养技术进行了研究。结果表明: GGB 的最佳诱导培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹, 诱导率为 95%; GGB 增殖培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹, 增殖系数为 5.3; 孢子体诱导培养基为 MS+BA0.7 mg·L⁻¹+NAA0.7 mg·L⁻¹, 诱导率可达到 82%; 适合诱导生根培养基为 MS+NAA0.2 mg·L⁻¹+0.1%Ag, 生根率为 100%。

关键词: 肾蕨; 离体培养; 绿色小体(GGB)

中图分类号: S682 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2009)05-0020-03

Studies on in vitro Culture of *Nephrolepis auriculata*

SI Liang

(Horticultural Sub-academy of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150069)

Abstract: Using the stem apex of the stolon of *Nephrolepis auriculata* as explants, the study on in vitro culture was conducted. The results showed that the most appropriate induction culture medium of GGB was MS+BA0.7 mg·L⁻¹, the ratio of induction was 95%. The most proper multiplication medium was MS+BA0.7 mg·L⁻¹, multiplication coefficient was to be 5.3; The medium for GGB to shoot was MS+BA0.7 mg·L⁻¹+NAA0.7 mg·L⁻¹, rate of inducement was 82%; The most appropriate roots-planting culture medium was MS+NAA0.2 mg·L⁻¹+0.1%Ag and the rooting rate was up to 100%.

Key words: *Nephrolepis auriculata*; in vitro culture; green globular bodies(GGB)

肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)又名篦子草、蜈蚣草等, 是肾蕨科肾蕨属骨碎补科多年生常绿草本植物, 原产于热带、亚热带地区, 喜温暖湿润的环境^[1]。肾蕨株型直立丛生, 复叶深裂奇特, 叶色浓绿, 常用于客厅、办公室和卧室的美化布置。近年, 由于肾蕨具有旺盛的生命力和保湿性, 在园林中得到了广泛的应用, 它常被栽植在荫蔽的地方或室内, 也可装饰路径, 以及作切叶及配植于专类植物园内^[2]。肾蕨的常规繁殖方式为分株, 其繁殖系数低, 且易造成植株品种退化, 观赏性下

降。利用组织培养技术可极大地提高繁殖系数, 保持品种观赏特性。本研究以肾蕨的匍匐茎茎尖为外植体对其离体培养技术进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

黑龙江省园艺分院智能温室内生长健壮的盆栽肾蕨(*Nephrolepis auriculata*)。

1.2 方法

1.2.1 无菌外植体的获得 取肾蕨匍匐茎茎尖为外植体。在超净台上于 75%酒精浸泡 30 s, 用无菌水冲洗一次, 再用 0.1%的升汞消毒 5~6 min, 无菌水冲洗 4~5 次, 无菌滤纸吸干, 在解剖镜下拨取 0.2~0.5 mm 大小茎尖。接种到诱导培养基上。

收稿日期: 2009-06-04

作者简介: 司亮(1980-), 女, 山东维县人, 硕士, 研究实习员, 主要从事组织培养和植物基因工程研究。E-mail: siliang7698192@163.com。

[3] 王朋, 刘丹, 梁文举. 微生物肥料对绿色食品蔬菜品质的影响[J]. 农业环境保护, 2002, 21(6): 562.

[4] 陈华葵. 土壤微生物学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981.

[5] 周吉奎, 胡岳华, 邱冠周. 硅酸盐细菌在矿物工程领域应用研究进展[J]. 金属矿山, 2002(1): 26-28.

[6] 李明, 张灼, 樊竹青. 硅酸盐细菌 JF88 菌株选育的研究[J]. 云南师范大学学报, 2001(3): 58-61.

[7] 黄昭贤, 彭盛德, 杨雪梅, 等. 硅酸盐细菌的研究现状及展望[J]. 世界农业, 1998(5): 28-31.

[8] 王平宇, 张树华. 硅酸盐细菌的分离及生理生化特性的鉴定[J]. 南昌航空工业学院学报, 2001(6): 78-82.

[9] 李凤汀, 郝正然, 杨则璠. 硅酸盐细菌 HM8841 菌株解钾作用的研究[J]. 微生物学报, 1997, 37(1): 79-81.

[10] 许光辉, 郑洪元. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京: 农业出版社, 1986: 135-136.