

土壤芽孢杆菌 NBT 菌株理化诱变筛选及其对作物生长的影响

盛下放, 何琳燕, 陈 珏

(南京农业大学生命科学院, 南京 210095)

摘要: 用紫外线加氯化锂(LiCl)复合诱变方式对释钾效能较强的土壤芽孢杆菌 NBT 菌株进行诱变处理, 得到抗高渗(2% NaCl)突变株 32 株。经高渗、高温及酸、碱诱导, 突变株 NBT-6 和 NBT-19 能够在 10% NaCl 溶液中存活, 同时能够耐受 35~55℃ 高温及 pH 4~10 的酸碱环境, 两突变株的释钾活性与出发菌株相当, 且传代稳定。辣椒、棉花盆栽试验表明, NBT-6 和 NBT-19 不仅能在作物根际土壤增殖, 而且能提高根际土壤有效磷、钾含量, 改善植株的钾素营养, 促进植株生长。

关键词: 土壤芽孢杆菌, 诱变, 辣椒, 棉花

Mutagenesis of the Strain NBT of *Bacillus edaphicus* and Its Effect on Growth of Chili and Cotton

SHENG Xia-fang, HE Lin-yan, CHEN Jue

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract: A strain NBT capable of dissolving silicate minerals and promoting plant growth was treated with UV + LiCl, 32 high osmotic pressure resistant mutants(2% NaCl) were screened. Two mutants(NBT-6 and NBT-19) that could survive in the 10% of sodium chloride solution and resistant to high temperature(35-55℃) and acid-base(pH 4-10) were obtained. In addition, the two mutants had the same ability as the starting strain(NBT) in dissolving potassium-bearing minerals, and they were stable. Pot experiments for chili and cotton showed that the two mutants can propagate in rhizosphere, increase available P and K contents in rhizospheric soil, improve plant potassium nutrition, and promote plant growth.

Key words: *Bacillus edaphicus*; Mutagenesis; Chili; Cotton

钾是作物生长所必需的三大营养元素之一, 而我国钾肥供需矛盾却日益尖锐^[1]。因此, 有关土壤磷、钾素养分微生物活化研究无论对于缓解钾肥供需矛盾, 还是对于提高作物产量, 改善作物品质, 提高我国农产品国际竞争力, 保护生态环境都具有十分重要的意义。

硅酸盐细菌在活化土壤中磷、钾、硅素营养及促生作用等方面已有不少研究^[2~6]。硅酸盐菌剂作为一种生产中常用的微生物肥料, 其功能的有效发挥必须满足两个基本条件: 一是菌株的高效性, 二是菌株本身对土壤环境的适应性(抗逆性), 包括与土

著微生物的竞争能力及适应土壤各种生态条件的能力。硅酸盐细菌的筛选、优化及功能测定等已有报道^[4,7,8], 但通过复合诱变法筛选具有溶磷、解钾和抗高渗、耐酸碱及高温的硅酸盐细菌的研究工作却少见报道, 为此, 笔者进行了本项研究, 以期对高效菌株筛选及硅酸盐菌剂的有效应用提供试验材料和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

由本室分离筛选的硅酸盐细菌 NBT 菌株, 经鉴

定为土壤芽孢杆菌, 现定名为土壤芽孢杆菌 NBT 菌株, 供试辣椒品种为苏椒 5 号, 供试棉花品种为泗棉 4 号, 供试土壤为黄棕壤, 其理化性状: 有机质 $18.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 全氮 $1.62 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效磷 $10.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 缓效钾 $461.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 速效钾 $91.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, pH 6.71, 细菌解钾作用试验培养基配方见文献 [5]; 细菌的诱变筛选用有氮培养基^[9]; 细菌计数用无氮培养基^[9]。

1.2 方法

1.2.1 诱变处理 采用 UV + LiCl 复合诱变。分别吸取 NBT 菌株对数生长期(28℃振荡培养 20 h)菌悬液($6.85 \times 10^7 \text{ cfu} \cdot \text{ml}^{-1}$)0.1 ml 涂布于含 0.1% ~ 0.6% LiCl 的无氮平板上, 在紫外灯下分别照射 10, 15, 20, 30, 60, 90 s, 28℃培养, 菌落长出后计数, 求各处理组的致死率。在致死率达 75% 以上的平板上各自挑取有代表性的菌落, 涂布在不同盐浓度(NaCl 浓度分别为 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 4%)的有氮平板上, 筛选在 2% 盐浓度平板上能生长的突变株。

1.2.2 抗逆性突变株诱导 将上述突变株转接斜面保存, 并进行摇瓶发酵, 然后分别在温度逐渐提高(35 ~ 55℃)的培养中获得耐高温(50℃)突变株。将耐高温突变株分别在 pH 逐渐升高(pH4 ~ 10)的培养基中诱导培养, 获得既耐高温又耐酸碱的突变株, 将上述突变株在浓度逐渐增加(2% ~ 10% NaCl)的有氮培养基上诱导, 以获得抗高渗、耐酸碱和耐高温的突变株(NBT-6 和 NBT-19)。

1.2.3 稳定性试验 将获得的突变株 NBT-6 和 NBT-19 分别在有氮培养基上连续进行 42 次传代

培养, 然后进行突变株生长势、解钾活性及耐酸碱和耐高温性能测定。

1.2.4 盆栽试验 试验用塑料盆钵, 每盆装土 800 g, 辣椒种子和棉花种子(种子事先用 6% H_2O_2 表面消毒)分别经 30℃浸泡 2 d 后取出阴干, 然后将种子分别浸泡于菌悬液、灭活菌悬液及蒸馏水中, 辣椒种子带活菌数分别为 $6.38 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{粒}^{-1}$ (NBT), $5.76 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{粒}^{-1}$ (NBT-6) 和 $7.15 \times 10^3 \text{ cfu} \cdot \text{粒}^{-1}$ (NBT-19); 棉花种子带活菌数分别为 $2.65 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{粒}^{-1}$ (NBT), $2.35 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{粒}^{-1}$ (NBT-6) 和 $3.58 \times 10^4 \text{ cfu} \cdot \text{粒}^{-1}$ (NBT-19)。将处理后的种子播在土壤表层, 覆土, 加适量无菌去离子水, 在 25 ~ 28℃温室培养。待出苗后每盆定苗 1 株, 注意补充水分和病虫害防治。每组处理设 4 次重复。培养至 60 d 后采样, 测根际土壤中土壤芽孢杆菌数、速效磷钾含量和植株地上部干物重及钾含量。磷钾含量测定参照文献 [10] 进行。土壤芽孢杆菌的测定采用稀释平板计数法, 测定突变株时, 培养基中的 NaCl 浓度调至 8%。

2 结果与分析

2.1 复合诱变对菌株的影响

应用 UV + LiCl 复合处理时, 菌株对紫外线更加敏感(表 1)。用同一浓度 LiCl 处理与 UV 照射时间呈现剂量效应, 照射 90 s 致死率为 100%。LiCl 浓度为 0.1% ~ 0.4% 时, 用 UV 照射相同的时间, 致死率相差不大。试验中发现菌株只能适应 0.1% ~ 0.3% 的 LiCl 剂量, 并取得了较好的处理效果, 理想的剂量为 0.1% ~ 0.3% LiCl, UV 15 ~ 30 s。

表 1 UV + LiCl 复合处理对菌株的致死率

Table 1 Dead rate of the strain NBT treated by UV + LiCl (%)

LiCl (%)	UV 照射时间 Time (s)					
	10	15	20	30	60	90
0.1	74.2	78.6	79.8	86.7	92.4	100
0.2	76.8	80.3	84.1	90.6	94.2	100
0.3	79.5	83.9	89.4	93.2	97.8	100
0.4	80.6	84.4	93.3	95.5	97.8	100
0.5	93.5	95.8	97.1	98.4	99.2	100
0.6	95.7	97.8	98.4	98.5	99.6	100

2.2 土壤芽孢杆菌的生长势

由图可以看出, 突变株 NBT-6 和 NBT-19 生长迅速, 24 ~ 36 h 后进入生长高峰期, 60 h 后菌体生长速度逐渐下降, 突变株与出发菌株生长速度基本相当。

2.3 突变株对酸、碱及高温的耐受性

突变株对酸碱的耐受性试验中, 其细胞存活率是指细胞在不同 pH 值的培养基中在 28℃培养 30 h 后的细胞数与在 pH 值为 7 条件下的细胞数之比; 突变株对高温的耐受性试验中, 其细胞存活率是指细胞在不同温度下培养 30 h 后的细胞数与 28℃培养条件下的细胞数之比。由表 2 可以看出, 通过 UV +

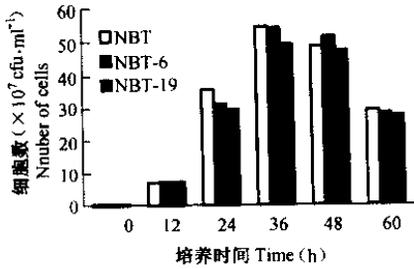


图 土壤芽孢杆菌及其突变株的生长曲线

Fig. Growth curves of the bacterium and its mutants

表 2 突变株对酸、碱、高温的耐受性

Table 2 Resistance of the mutants to acid-base and temperature

菌株 Strains	细胞存活率 Survival rate (%)									
	pH					温度 Temperature(°C)				
	4.0	5.0	6.0	8.0	9.0	10.0	35	40	45	55
NBT	23.5	48.6	86.8	90.2	61.4	56.2	86.2	71.4	60.2	51.5
NBT-6	86.8	88.6	95.4	98.8	104.7	97.6	101.4	101.2	106.4	110.2
NBT-19	90.1	92.3	96.3	102.4	105.4	98.2	103.6	102.6	109.7	115.6

2.4 突变株对高渗的耐受性

由表 2 和表 3 可以看出,通过 UV + LiCl 复合诱变并经驯化获得的 2 株土壤芽孢杆菌突变株 NBT-6 和 NBT-19 不仅对酸碱、高温有一定的抗性,

LiCl 复合诱变并经驯化获得的 2 株土壤芽孢杆菌突变株 NBT-6 和 NBT-19 在 pH 4 ~ 10 的存活率分别为 86.8% ~ 104.7% 和 90.1% ~ 105.4%, 而出发菌株在 pH 4 和 pH 10 的细胞存活率仅分别为 23.5% 和 56.2%; 而高温耐受性试验表明, NBT-6 和 NBT-19 不仅能在 pH 4 ~ 10 的环境中较好地存活, 而且也能在高温下较好地生存, 与在 28°C 培养条件下的细胞数相比, 2 株突变株在 35 ~ 55°C 的温度下不仅能存活, 而且还能增殖, 而出发菌株在同样条件下不能正常生长, 其细胞存活率仅为 51.5% ~ 86.2%。

而且对高渗也表现出较强的耐受能力。盐浓度 (NaCl) 在 2% ~ 10% 的有氮培养基中, 突变株 NBT-6 和 NBT-19 存活率分别为 91.8% ~ 114.7% 和 93.1% ~ 108.4%。

表 3 突变株在不同盐浓度中的细胞存活率

Table 3 Survival rate of the mutants in NaCl solution (%)

突变株 Mutants	NaCl (%)				
	2	4	6	8	10
NBT-6	114.7	110.5	98.8	94.6	91.8
NBT-19	108.4	102.4	95.5	94.8	93.1

2.5 稳定性试验

将突变株 NBT-6 和 NBT-19 进行连续传代培养, 将 42 次转接的斜面同时进行活化发酵试验, 结果见表 4。由表 4 可以看出, NBT-6 和 NBT-19 经

42 次传代, NBT-6 和 NBT-19 从钾长石中释放的钾分别稳定在 59.2 ~ 63.0 mg·L⁻¹ 和 56.7 ~ 59.8 mg·L⁻¹, 具有稳定的解钾功能。

表 4 突变株对钾长石的分解作用(以溶液中的钾含量表示)

Table 4 Dissolution of feldspar by the mutants (showed with the concentration of K in solution, mg·L⁻¹)

菌株 Strains	传代数 Passage number					
	P2	P4	P6	P8	P10	P42
NBT	64.1	64.2	63.8	63.5	64.0	62.9
NBT-6	62.4	63.0	61.8	59.2	61.5	59.8
NBT-19	59.8	58.8	58.2	56.7	57.6	57.2

2.6 土壤芽孢杆菌对作物生长发育及根际环境的影响

由表 5 可以看出, NBT 菌株、突变株 NBT-6 和 NBT-19 接菌处理比接灭活菌液处理的辣椒植株干

重分别增加 29.4%、29.6%和 24.3% ,棉花植株干重分别增加 30.5%、49.4%和 24.3% ;而辣椒植株钾含量则分别增加 16.2%、13.7%和 13.9% ,棉花植株钾含量则分别增加 19.8%、19.5%和 14.9% 。另外 ,NBT 菌株、突变株 NBT-6 和 NBT-19 不仅能在植株根际存活 ,而且能够大量增殖。辣椒种子带活菌数分别为 6.38×10^3 cfu·粒⁻¹(NBT)、 5.76×10^3 cfu·粒⁻¹(NBT-6)和 7.15×10^3 cfu·粒⁻¹(NBT-19)。60 d 后植株根际土壤土壤芽孢杆菌数量分别增加到 3.68×10^5 cfu·g⁻¹(NBT)、 3.74×10^5 cfu·g⁻¹(NBT-6)和 3.15×10^5 cfu·g⁻¹(NBT-19)。棉花种子带活菌数分别为 2.65×10^4 cfu·粒⁻¹(NBT)、 2.35×10^4 cfu·粒⁻¹(NBT-6)和 3.58×10^4 cfu·粒⁻¹(NBT-19)。60 d 后植株根际土壤土壤芽孢杆菌数量分别增加到 3.67×10^6 cfu·g⁻¹(NBT)、 3.16×10^6 cfu·g⁻¹(NBT-6)和 3.08×10^6 cfu·g⁻¹(NBT-

19)。辣椒植株根际土壤速效磷含量 ,接菌处理为 $6.82 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (NBT)、 $6.95 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (NBT-6)和 $6.62 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (NBT-19) ,比接灭活菌液处理分别增加了 46.6%(NBT)、59.4%(NBT-6)和 61.4%(NBT-19) ;棉花植株根际土壤速效磷含量 ,接菌处理比接灭活菌液处理分别增加了 48.6%(NBT)、61.2%(NBT-6)和 63.2%(NBT-19)。辣椒植株根际土壤速效钾含量 ,接菌处理比接灭活菌液处理分别增加了 188.0%(NBT)、186.1%(NBT-6)和 186.7%(NBT-19)。棉花根际土壤速效钾含量 ,接菌处理比接灭活菌液处理分别增加了 182.5%(NBT)、186.6%(NBT-6)和 191.3%(NBT-19)。由此可见 ,接种土壤芽孢杆菌 NBT 菌株及其突变株 ,可以促进植株的生长发育 ,改善植株钾素营养状况 ,提高根际土壤速效磷、钾含量。

表 5 NBT 菌株及其突变株对作物生长发育和根际环境的影响

Table 5 Effect of the strain NBT and the mutant strains on the growth and rhizospheric soil of crops

菌株 Strains	处理 Treatments	速效磷含量 Available P ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		速效钾含量 Available K ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)		干重 Dry weight ($\text{g} \cdot \text{pot}^{-1}$)		植株钾 K in plants ($\text{mg} \cdot \text{pot}^{-1}$)		细胞数 Number of cells ($\times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$)	
		辣椒 Chili	棉花 Cotton	辣椒 Chili	棉花 Cotton	辣椒 Chili	棉花 Cotton	辣椒 Chili	棉花 Cotton	辣椒 Chili	棉花 Cotton
		NBT	接菌 Bacteria	6.82	7.12	92.52	94.85	3.65	3.98	140.9	151.4
	接灭活菌 Dead bacteria	4.65	4.79	32.12	33.58	2.82	3.05	121.3	126.4	0.021	0.023
NBT-6	接菌 Bacteria	6.95	7.48	95.10	98.36	3.81	4.87	156.0	171.4	37.4	316
	接灭活菌 Dead bacteria	4.36	4.64	33.24	34.32	2.94	3.26	137.4	143.4	0.00	0.00
NBT-19	接菌 Bacteria	6.62	7.15	92.25	97.15	3.38	4.51	137.3	149.9	31.5	308
	接灭活菌 Dead bacteria	4.10	4.38	32.18	33.35	2.72	3.14	120.6	130.5	0.00	0.00
	对照 CK	3.86	4.18	30.16	31.65	2.45	2.67	118.8	120.3	0.016	0.02

3 讨论

目前硅酸盐细菌的种类主要有环状芽孢杆菌 (*Bacillus circulans*)^[11]、胶质芽孢杆菌 (*B. mucilaginosus*)^[12]和土壤芽孢杆菌 (*B. edaphicus*)^[13]等。硅酸盐菌剂作为一种微生物肥料已有了长足的发展。大量研究表明,硅酸盐细菌能促进作物生长,改善作物品质和土壤营养状况,减少化学钾肥的施用量,降低成本,在农业可持续发展中发挥着重要作用。硅酸盐细菌功能发挥的前提条件是要筛选出优良的菌株,此菌株既要有高效的溶磷、解钾及促进作物生长的功能,又要有比较广泛的适应功能,即对酸、碱、高温及高渗环境的抗性或耐受性。高效菌株的获得有两个基本途径,一是从特殊环境中分离、筛选^[4];二是对已有的高效菌株的诱变筛选。本试验是对本研究组保存的 1 株强溶磷解钾功能的土壤

芽孢杆菌 NBT 菌株进行复合诱变,然后经一定的条件驯化,从 386 个菌株中筛选获得 2 株对酸、碱、高温及高渗有强抗性的突变株,突变株在生长势、溶磷、解钾功能上与出发菌株相当,且这些突变株的上述性能稳定。用 LiCl 和紫外线复合处理较单独使用紫外线诱变处理,正突变率增加,且发生回复突变的机率小。这种复合诱变效应已在抗生素产生菌的诱变育种中得到应用^[14]。因此,对土壤芽孢杆菌 NBT 菌株诱变育种,不仅对于深入阐明硅酸盐细菌的促生机理,而且对于硅酸盐细菌的有效应用均有重要意义。

References

- [1] 金继运. 土壤钾素研究进展. 土壤学报, 1993, 30(1): 94-100.
Jin J Y. The progress of soil potassium. *Acta Pedologica Sinica*, 1993, 30(1): 94-100. (in Chinese)

- [2] 薛泉宏 沈建伟 汤 莉. 钾细菌对壤土养分活化作用的研究. 西北农业学报, 2000, 9(3): 67-71.
Xue Q H, Shen J W, Tang L. Effect of the K bacteria on nutrients activation in loess soil. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2000, 9(3): 67-71. (in Chinese)
- [3] 李凤汀 郝正然 杨则媛 张春莉. 硅酸盐细菌 8841 菌株解钾作用的研究. 微生物学报, 1997, 37(1): 79-81.
Li F T, Hao Z R, Yang Z Y, Zhang C L. Studies on the ability of silicate bacteria HM8841 strain dissolving potassium. *Acta Microbiologica Sinica*, 1997, 37(1): 79-81. (in Chinese)
- [4] 林启美 饶正华 孙焱鑫 姚 军 刑礼军. 硅酸盐细菌的筛选及其对番茄营养的影响. 中国农业科学, 2002, 35(1): 59-62.
Lin Q M, Rao Z H, Sun Y X, Yao J, Xing L J. Identification of a silicate-dissolving bacterium and its effect on tomato. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(1): 59-62. (in Chinese)
- [5] 盛下放 黄为一 殷永娟. 硅酸盐菌剂的应用效果及其解钾作用的初步研究. 南京农业大学学报, 2000, 23(1): 43-46.
Sheng X F, Huang W Y, Yin Y X. Effects of application of silicate bacteria fertilizer and its potassium release. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2000, 23(1): 43-46. (in Chinese)
- [6] Monib M, Zahra M K, Abdel-Al S I, Heggo A. Role of silicate bacteria in releasing K and Si from biotite and orthoclase. *Soil Biology and Conservation of the Biosphere*, 1986: 733-743.
- [7] 盛下放 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株释钾条件的研究. 中国农业科学, 2002, 35(6): 673-677.
Sheng X F, Huang W Y. Study on the conditions of potassium release by strain NBT of silicate bacteria. *Scientia Agricultura Sinica*, 2002, 35(6): 673-677. (in Chinese)
- [8] 李 华 陈万仁. 胶质芽孢杆菌及其突变株生理特性的初步研究. 土壤肥料, 2001, 2: 28-33.
Li H, Chen W R. Primary study on the physiological characters of bacillus mucilaginosus and its mutant strains. *Soil Fertilizer*, 2001, 2: 28-33. (in Chinese)
- [9] 盛下放 黄为一, 曹晓英. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾效能及对钾的吸持作用. 植物营养与肥料学报, 2001, 7(4): 459-466.
Sheng X F, Huang W Y, Cao X Y. Dissolution of feldspar and potassium uptake by the strain NBT of silicate bacterium. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2001, 7(4): 459-466. (in Chinese)
- [10] 南京农业大学主编. 土壤农化分析(第二版)北京: 农业出版社, 1996: 29-91.
Nanjing Agricultural University. *Analytical Methods of Soil and Agricultural Chemistry*. Beijing: Agricultural Press, 1996: 29-91. (in Chinese)
- [11] Zahra M K, Monib M, Abdel-Al S I. Significance of soil inoculation with silicate bacteria. *Zentralblatt fur Mikrobiologie*, 1984, 139(5): 349-357.
- [12] Avankyan Z A, Pivovarova T A, Karavaiko G I. Properties of a new species, *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya*, 1986, 55: 477-482.
- [13] Shelobolina E S, Avakyan Z A, Bulygina E S. Description of a new species of mucilaginosus bacteria, *Bacillus edaphicus* sp. nov. and confirmation the taxonomic status of *Bacillus mucilaginosus*. *Mikrobiologiya*, 1997, 66: 813-822.
- [14] 朱坚屏 倪雍富 荣 洁. 提高西索米产生菌产量的遗传育种. 中国抗生素杂志, 1998, 23(2): 129-132.
Zhu J P, Ni Y F, Rong J. Study on genetic breeding of higher sisomicin-producing strain. *Chinese Journal of Antibiotics*, 1998, 23(2): 129-132. (in Chinese)

(责任编辑 李世娟)