

烟草根际解钾菌的筛选与鉴定

刘璇^{1,2}, 孔凡玉¹, 张成省¹, 王静¹, 冯超¹, 赵杰^{1,2}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101; 2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081)

摘要: 以钾长石粉为唯一钾源的硅酸盐细菌选择性培养基, 利用梯度稀释分离法和平板划线分离法对烟草根际土壤的细菌进行筛选。用火焰分光光度法测定培养液内的速效钾含量, 以筛选出高效菌株。通过形态观察和 16S rDNA 序列分析对菌株进行种属鉴定, 得到 8 个高效解钾菌。结果表明, 变栖克雷伯氏菌(*Klebsiella variicola*)、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)、阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*) 产生速效钾的能力较强。

关键词: 烟草; 解钾菌; 速效钾; 16S rDNA

中图分类号: S572.06

文章编号: 1007-5119 (2012) 03-0028-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.03.006

Isolation and Identification of the Potassium-releasing Bacteria from Tobacco Rhizosphere

LIU Xuan^{1,2}, KONG Fanyu¹, ZHANG Chengsheng¹, WANG Jing¹, FENG Chao¹, ZHAO Jie^{1,2}

(1. Tobacco Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 2. Graduate School of CAAS, Beijing 100081, China;)

Abstract: In this study, we separated and purified the bacteria for releasing insoluble potassium from soil by a selective medium in which potash feldspar power was treated as the only source of potassium. We diluted the bacteria with gradient and lined on culture plate for separation and purification of the bacteria for release potassium, and used flame spectrophotometer to determine potassium content in nutrient solution, and then selected high efficiency bacteria. The results show that *Klebsiella variicola*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* and *Pantoea agglomerans* were good for release available potassium from potash feldspar power. Therefore, these bacteria can be used as candidate strain for production of microbial fertilizer.

Keywords: tobacco; potassium releasing bacteria; available potassium; 16S rDNA

钾几乎可以参与烟株体内所有的代谢过程^[1], 对烟株的物质代谢和能量代谢有很大的影响。增施钾肥和提高土壤中钾的有效性是提高烟叶钾含量的有效途径^[2-3]。然而, 我国钾肥资源较为匮乏, 而且单纯增施钾肥并不能提高烟叶中的钾含量^[4-5]。因此, 开辟新的效果好、成本低且不污染环境的解钾菌, 充分利用土壤中的钾素资源, 对发展生态、经济农业具有十分重要的意义。

解钾菌能够将土壤中的固定态钾分解, 转化为作物可以直接吸收利用的有效钾, 而且它分泌的一些活性物质可以促进植物的生长。因此解钾菌是理想的生物肥料^[6-7]。

本研究对解钾菌进行了解钾能力测定和菌种鉴定, 探了解钾菌是否可以增加培养液中可溶性钾的含量, 以期为制成烟草大田解钾菌菌肥提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

土样: 山东省青岛市即墨采集的烟草根际土壤。钾源: 钾长石。分析纯试剂: NaH₂PO₄, MgSO₄·7H₂O, FeCl₃, 蔗糖, CaCO₃。生化试剂: 琼脂, 牛肉膏, 蛋白胨。主要仪器: 超净工作台, 离心机, 火焰光度计, 高压灭菌锅, 摇床。解钾细

菌培养基:NaH₂PO₄ 2.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, FeCl₃ 0.05 g, 蔗糖 5.0 g, CaCO₃ 0.1 g, 钾长石粉 1.0 g, 琼脂 15~20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.0~7.5。牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3.0 g, 蛋白胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 15~20 g, 水 1000 mL, pH 7.4~7.6。

1.2 方法

本试验于 2010 年 9 月在中国农业科学院烟草研究所即墨基地进行,从烟草根际土壤中分离筛选出解钾菌。

1.2.1 钾细菌的分离纯化 取根际土样 1 g 放入 100 mL 解钾细菌培养基的三角瓶中,28 °C 下进行摇床培养 72 h。采用 10 倍稀释法,制成 10⁻¹~10⁻⁷ 稀释度悬液。

取上述制成 10⁻³~10⁻⁷ 稀释度的根际菌悬液 50 μL 在解钾细菌培养基上涂布,每一稀释度 3 个重复。在 28 °C 温箱中培养,以钾细菌的菌落形态(呈玻璃珠状,透明,凸出,挑取时有粘稠感等)为标准进行挑取,进一步纯化,选取长势较好的菌株保藏,以便用于进一步研究^[8]。

1.2.2 解钾菌的速效钾产生能力测定 解钾细菌的摇床培养:将配好的钾细菌液体培养基按每瓶 50 mL 的装量加入 250 mL 的三角瓶中,0.1MPa 20 min 灭菌,冷却后接进 1 mL 解钾菌液,并设置不接种的空白对照。接种后,28 °C、150 rpm 振荡培养 7 d。

上清液速效钾测定:将在三角瓶中培养好的钾细菌发酵液倒出并定容至 50 mL,将发酵液在 500 rpm 下离心 10 min,除去发酵液中的不溶性物质,然后取 10 mL 的菌液 10 000 rpm 离心 10 min,取上清液测定水溶性钾含量^[9]。

1.2.3 解钾菌的 16S rDNA 鉴定 模板 DNA 的提取:去细菌培养物 1~5 mL (10⁶~10⁸ 个细胞,最多不超过 2×10⁹ 个细胞),10 000 rpm 离心 1 min,弃净上清。向沉淀中加入 180 μL Buffer GTL,震荡使菌体重悬。

加入 20 μL Proteinase K,涡旋混匀,70 °C 孵育直至菌体完全裂解,孵育过程中每隔一段时间颠倒或震荡离心管使样本分散。

涡旋振荡 15 s,加 200 μL Buffer GL,涡旋振荡充分混匀;加 200 μL 无水乙醇,涡旋振荡充分混匀(加入 Buffer GL 和无水乙醇后可能产生白色沉淀,不会影响后续实验)。

将上一步所得溶液(包括形成的沉淀)全部加入 Spin Column DM 中(Spin Column DM 已放入 Collection Tube),8000 rpm 离心 1 min,弃废液,将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

向 Spin Column DM 中加入 500 μL Buffer GW1(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),8 000 rpm 离心 1 min,弃废液,将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

向 Spin Column DM 中加入 500 μL Buffer GW2(使用前请先检查是否已加入无水乙醇),14 000 rpm 离心 1 min,弃废液,将 Spin Column DM 放回 Collection Tube 中。

14 000 rpm 离心 2 min,弃废液。将 Spin Column DM 置于室温放置数分钟,以彻底晾干吸附材料中残余的 Buffer GW2。

将 Spin Column DM 转入一个新的离心管中,向膜的中间部位悬空滴加 200 μL Buffer GE,室温放置 1~5 min,8000 rpm 离心 1 min,将溶液收集到离心管中。-20 °C 保存 DNA。

反应使用的上游引物为:

5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

反应使用的下游引物为:

5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3'

反应体系(50 μL)

Template DNA	0.5 μL
Forward Primer	1 μL
Reverse Primer	1 μL
10× <i>TransTaq</i> -T Buffer	5 μL
2.5 Mm dNTPs	4 μL
<i>TransTaq</i> DNA Polymerase	0.5 μL
ddH ₂ O	38 μL

PCR 循环：

94 °C	1 min	} 30 cycles
94 °C	30 sec	
48 °C	30 sec	
72 °C	5 min	
72 °C	10 min	
4 °C	∞	

由上海英骏生物技术有限公司北京测序部测序。

2 结果

2.1 菌落基本特征

初筛选菌落 28 °C 在筛选培养基上培养 48 h 得到 8 个典型菌落，并进一步纯化菌落 28 °C 在筛选培养基上培养 48 h，菌落特征见表 1。

表 1 菌落形态与菌体基本形态特征

Table1 The morphology colony and basic characteristics of morphological

菌株	菌落形态	菌体形态	芽孢形态
K-GX1	菌落凸起，乳白色，表面光滑，有光泽	直杆状	无
K-GX4	菌落稍呈圆形有闪光	粗短杆状	无
K-GX5	菌落光滑、透明、边缘清楚，会或不会产生黄色色素	直杆状	无
K-GX6	菌落呈圆形，便面光滑，隆起，边缘整齐，正反面乳白色	直杆状	无
K-JM-J5	菌落圆形边缘整齐，表面光滑，半透明，小凸起	直杆状	无
K-XHJ3	菌落圆形隆起粉色，表面光滑边缘整齐	杆状	无
K-JM-B1	菌落不透明，有光泽，黄色	细杆菌	无
K-JM-B2	菌落圆形扁平边缘整齐，呈深黄色，带香味，光滑不透明	长杆状	无

2.2 速效钾产生能力

利用钾长石为唯一钾源筛选培养基从植物根际土壤中筛选具有分解钾矿的微生物，对所得 8 个菌株，分别扩大培养进行解钾实验，以 CK（不接种）作为对照，各接种培养液中速效钾增加百分比见图 1。

所选菌株中以菌株 K-GX4 的产生速效钾能力最强，其培养液中速效钾含量增加 174.2%，K-XHJ3、K-JM-J5、K-GX5、K-GX1 次之，培养液中速效钾含量增加分别为 146.99%、123.21%、121.23%、101.73%。培养液中速效钾含量增加小于 100% 的菌株为 K-JM-B2、K-GX6、K-JM-B1，其速

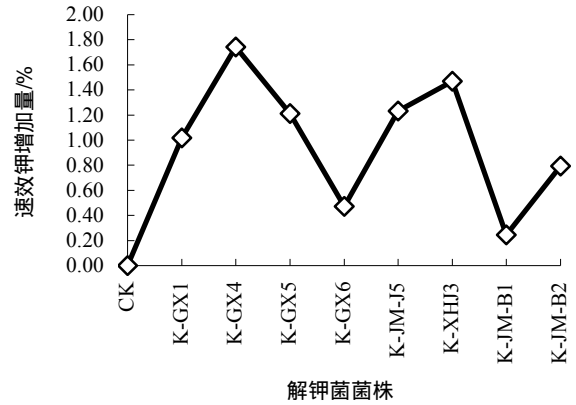


图 1 速效钾增加量百分比

Fig. 1 Increase in the percentage of available potassium

效钾含量分别增加 79.27%、47.25%、24.51%。

2.3 16SrRNA 基因序列分析

将测序结果输入 Gen-Bank 利用 BLAST 软件，将测定得到的基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行同源性分析，获取同源性较高的相邻的种、属的 16S rDNA 序列，得到结果如表 2 所示。

表 2 GenBank 中 Blast 得到 8 种的菌株的结果

Table 2 The result of 8 strains in GenBank

菌株	菌株名称	同源性
K-GX1	阿氏肠杆菌 (<i>Enterobacter asburiae</i>)	98%
K-GX4	变栖克雷伯氏菌 (<i>Klebsiella variicola</i>)	99%
K-GX5	成团泛菌 (<i>Pantoea agglomerans</i>)	99%
K-GX6	洋葱伯克霍尔德氏菌 (<i>Burkholderia cepacia</i>)	100%
K-JM-J5	阴沟肠杆菌 (<i>Enterobacter cloacae</i>)	98%
K-XHJ3	产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>)	98%
K-JM-B1	<i>Microbacterium foliorum</i> (2001 年发表新种)	98%
K-JM-B2	拟香味类香味菌 (<i>Myroides odoratimimus</i>)	99%

3 讨论

从青岛即墨烟草根际土壤中筛选到的 8 株解钾菌，通过测定各菌株培养液中钾含量来评价其解钾能力。其中以变栖克雷伯氏菌 (*Klebsiella variicola*) 产生速效钾解钾的能力最强，以产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 成团泛菌 (*Pantoea agglomerans*) 阿氏肠杆菌 (*Enterobacter asburiae*) 4 种菌解钾能力较强，较弱的为洋葱伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia cepacia*) *Microbacterium foliorum*、拟香味类香味菌 (*Myroides odoratimimus*)。而且 62.5% 的菌株的培养液中速效钾含量增加超过 100%。

同实验室富营养的培养条件相比,自然条件下的细菌往往处于“饥饿”状况,而这正是细菌在自然界生活的正常环境。解钾细菌和其他细菌一样,在自然条件下极易受到环境条件的影响,如植物的种类、土壤肥力、水分、日长、光照强度、生长季节的长短、温度的变化以及其他土壤微生物和原生动物的影响,这些条件中的任何一个发生变化,都有可能直接或间接地影响解钾菌的生长。因此,尽管本研究筛选到的解钾菌株都具有分解钾长石矿粉的能力,但在自然环境条件下情况十分复杂,若再通过盆栽试验和大田试验相结合的方法,从改善土壤生态环境、提高肥料利用率,改善烤烟根际营养水平、增强根系吸收能力,合理平衡、协调各生育期的营养及代谢状况等方面进一步研究确认后,即可作为制作微生物肥料优先选用菌。

将解钾菌制成生物肥料可增加烟草根际可溶性钾的含量,有利于烟草钾元素的吸收,从而提高烟叶产量和烟叶品质。烟草生物肥料具有无毒、无害、无污染、肥效长、节约能源等无机肥料所不及的优点^[10]。从发展趋势看,生物肥料在现代农业生产中将发挥越来越大的作用,代表着未来肥料发展的方向。

参考文献

- [1] 何念祖,孟赐福. 植物营养原理[M]. 上海:上海科学技术出版社,1987.
- [2] 马朝文. 中国烟叶低钾含量的成因及解决途径探讨[J]. 作物研究,2006(2):190-193.
- [3] 李强,李章海,黄义德. 中国烟叶含钾量研究现状及其提高途径探讨[J]. 安徽农业科学,2007,35(2):452-453,455.
- [4] 郭合营,刘镇平,王荣,等. 豫西烤烟钾肥施用量与施肥方法试验研究[J]. 烟草科技,1995(2):35-37.
- [5] 宋荣官,王鹏. 烤烟钾肥施用技术与效果研究[J]. 中国林副特产,1997(1):12-13.
- [6] 葛诚. 微生物肥料生产应用基础[M]. 北京:中国农业科技出版社,2000:1-27.
- [7] 农业部肥政药政管理办公室. 肥料登记指南[M]. 北京:农业出版社,2002:87-96.
- [8] 王志成. 磷钾细菌的分离筛选与培养研究[J]. 长沙电力学院学报:自然科学版,2002,17(4):76-78.
- [9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [10] 窦玉青,刘永中,姜鹏超,等. 普利生物肥在烤烟上的应用研究初报[J]. 中国烟草科学,2000,21(4):14-16.