

宋 聪, 宋水山, 贾振华. 高效解钾菌的分离筛选鉴定及其对山区黄瓜的促生效果[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(17): 266-270.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.053

高效解钾菌的分离筛选鉴定及其对山区黄瓜的促生效果

宋 聪, 宋水山, 贾振华

(河北省科学院生物研究所/河北省主要农作物病害微生物控制工程技术研究中心, 河北石家庄 050081)

摘要:我国耕地土壤钾元素严重匮乏,亟须解决我国北方山区土壤缺钾的现状,寻求钾肥替代技术。从各地土壤中筛选得到1株高效解钾菌32-2,在含钾矿石的复筛培养基中发酵15 d,发酵液中可溶性钾含量达到37.77 mg/L,是对照的16.22倍,经鉴定为草木樨中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*)。通过盆栽试验结果表明,与对照相比,32-2对黄瓜种子、幼苗有显著的促生效果,其中发芽率提高13.33个百分点,发芽势提高8.08个百分点,株高、地下鲜质量、地上干质量、壮苗指数、干重根冠比、根系活力分别提高15.83%、13.95%、7.45%、5.19%、9.46%、38.52%;同时,可显著提高黄瓜产量和品质,黄瓜产量增加8.50%,可溶性固形物、可溶性糖、维生素C、可溶性蛋白含量分别提高6.82%、2.78%、43.21%、20.90%。今后32-2可用于微生物肥料的开发。

关键词:土壤解钾菌;筛选;鉴定;草木樨中华根瘤菌;黄瓜;促生效果

中图分类号: S182;S642.206 **文献标志码:** A **文章编号:**1002-1302(2020)17-0266-04

钾是植物生长所必需的三大营养元素之一,直接影响着植物的生长发育和抗逆性^[1]。我国北方山区农作物生长缓慢,品质和产量均低于平原地区,这跟土壤有机质含量低、微生物数量与种类少、植物生长的营养元素缺乏等有关,其中有效钾含量低是造成植物生长缓慢的主要因素之一。实际上北方山区土壤并不缺钾,然而95%的土壤钾以矿物钾的形态存在,主要存在于钾长石和云母中^[2],不能直接被农作物吸收和利用。因此,如何转化土壤中的矿物钾为有效钾,对缓解我国钾素供给的压力、提高农作物产量具有重要意义。微生物是地球矿质元素转化的原动力,采用解钾微生物作为土壤中钾素资源利用的转化因子,是解决山区土壤缺少有效钾的有效途径。

吴洪生等研究表明,在一定条件下,钾细菌制剂可分解土壤矿物中难溶性钾,使土壤速效钾含量

比对照提高128.6%^[3]。张红娟等试验结果表明,接种钾细菌能促进土壤中速效钾、磷含量较对照分别提高13.2%、84.5%^[4]。多项研究结果表明,解钾菌对多种植物具有促进生长、改善品质的作用。其中,郭勋斌等发现解钾菌对水稻的生长发育具有促进作用^[5]。吴洪生等研究指出,解钾菌还可改善花生品质,使花生增产17.93%^[6]。薛智勇等研究发现,甘薯接种解钾菌可增产6.95%~10.27%^[7]。那文志等田间试验结果表明,解钾菌对大豆有明显的增产效果,较对照增产16.85%,还可提高大豆根瘤的结瘤数,并在一定程度上抑制病虫害,起到防病、抗病、增产的效果^[8]。虽然关于高解钾率的细菌已有报道,但其绝对解钾量还是很小的,所以分离筛选高效解钾菌株仍是现在研究的重点之一。本试验从全国不同山区采集的土样中分离筛选高效解钾菌株并进行鉴定,检测筛选到的解钾菌株对钾元素的利用效果,同时研究解钾菌对黄瓜种子、幼苗的促生效果及产量和品质的影响,为微生物肥料的开发提供理论依据和材料基础。

据资料显示,我国的钾肥生产只占世界的0.34%,而消耗量却占14.7%,虽然每年进口约600万t钾肥^[9],但仍不能满足农业生产对钾肥的需要。在化学钾肥供不应求的情况下,开辟新的效果好、成本低、无污染的微生物肥料,挖掘山区土壤中的

收稿日期:2019-10-11

基金项目:河北省科技计划(编号:16227505D);河北省科学院科技计划(编号:17311)。

作者简介:宋 聪(1982—),女,河北石家庄人,硕士,副研究员,从事微生物资源利用研究。Tel:(0311)83014618;E-mail:songcong1982@126.com。

通信作者:贾振华,博士,研究员,从事微生物资源利用的研究。Tel:(0311)83014618;E-mail:zhenhuaj@hotmail.com。

钾素资源,具有重要的研究和应用意义。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试土壤和菌株 试验用于解钾菌分离的土壤分别采集于河北、黑龙江、山西、云南等地的山区和丘陵地区,土壤样品共 75 个;供试菌株主要为胶质状芽孢杆菌 10013,购自中国农业科学院微生物种保藏管理中心;黄瓜品种为津研 1 号,由天津农业科学研究院天津蔬菜研究所选育。

1.1.2 培养基 培养基主要有阿须贝氏培养基(0.2 g KH_2PO_4 、0.2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g NaCl 、5 g CaCO_3 、10 g 甘露醇、0.1 g $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、18 g 琼脂、1 000 mL 水,pH 值 6.8~7.0)、解钾菌选择培养基(5 g 蔗糖、2 g Na_2HPO_4 、0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.005 g FeCl_3 、0.1 g CaCO_3 、1 g 钾长石(400 目)、18 g 琼脂、1 000 mL 水)、解钾菌复筛培养基[10 g 蔗糖、1 g Na_2HPO_4 、0.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 g 酵母粉、0.1 g NaCl 、0.1 g CaCO_3 、0.005 g FeCl_3 、5 g 钾长石、1 000 mL 水]。

1.1.3 主要仪器与试剂 *Taq* 聚合酶、DNA marker、PCR 产物纯化试剂盒均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;引物合成和 DNA 测序由上海英骏生物技术有限公司完成,其他试剂为国产分析纯。电泳仪 PCR 仪购自 Bio-RAD 公司,紫外可见分光光度计均购自岛津企业管理(中国)有限公司。

1.1.4 供试土壤 盆栽土壤取自邢台市信都区浆水镇前南峪村山区土壤,其理化性质:有机质含量为 24.13 g/kg,全氮含量为 1.43 g/kg,全磷含量为 0.91 g/kg,全钾含量为 20.03 g/kg,速效氮含量为 89.15 mg/kg,速效磷含量为 47.15 mg/kg,速效钾含量为 119 mg/kg,pH 值为 7.3。

1.2 试验方法

1.2.1 解钾菌的分离筛选 从邢台等地采集共 75 份土样,取 10 g 土样加入到含 90 mL 无菌水的三角瓶中,振荡培养 30 min,将土壤悬液稀释 10^3 、 10^4 、 10^5 倍,取 100 μL 土壤悬液涂布在阿须贝培养基和解钾菌选择性培养基中,30 $^\circ\text{C}$ 培养 3~4 d,挑取圆形、透明、表面湿润黏稠的大菌落,划线纯化 3 次,将纯培养菌株于 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。

1.2.2 解钾菌解钾能力的测定 采用解钾菌复筛培养基,按 5% 的接种量接种 $D_{600\text{nm}}$ 值为 1.5 的各菌株发酵液,28 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 培养 15 d,于培养 3、6、

9、12、15 d 采用原子吸收法测定发酵液中的可溶性钾含量。

1.2.3 解钾菌 32-2 的鉴定 在解钾菌选择培养基进行菌株培养,48 h 观察菌落形态。(1)菌株形态和生理生化鉴定。参照文献[10]对菌株进行形态观察和生理生化试验。(2)菌株 16S rDNA 鉴定。采用通用引物 27F:(5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') 和 1492R:(5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3'),用菌落 PCR 扩增菌株的 16S rDNA 选用扩增体系(25 μL):10 \times *Taq* Buffer 2.5 μL ,25 mmol/L Mg^{2+} 2.0 μL ,2.5 mmol/L dNTP 2.0 μL ,25 pmol/ μL 引物各 0.5 μL ,*Taq* 0.3 μL ,ddH₂O 17.2 μL 。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,52 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 90 s,循环 30 次;72 $^\circ\text{C}$ 终末延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保温。

PCR 产物经回收试剂盒纯化,送上海英骏生物技术有限公司进行测序,测序结果提交 NCBI 数据库中进行序列比对分析,选取同源性较高的序列,利用 MEGA 5.0 软件,构建菌株系统发育进化树。

1.2.4 解钾菌对黄瓜种子和幼苗的促生效果 挑选籽粒饱满的黄瓜种子,用 75% 乙醇表面消毒 30 s,蒸馏水洗涤 3~4 遍,25 $^\circ\text{C}$ 恒温培养箱中浸种 24 h,然后置于铺有灭菌湿纱布的培养皿上,室温下催芽。待黄瓜种子整齐发芽后,播种于 50 孔塑料穴盘中,盘中装有经 2 次高压蒸汽灭菌的山区菜园土,试验分 3 个处理:处理 1,菜园土中浇灌浓度为 1×10^8 CFU/mL 32-2 菌悬液;处理 2,浇灌浓度为 1×10^8 CFU/mL 10013 菌悬液;处理 3,清水对照(CK)。将解钾菌接于发酵培养基中,25 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 48 h。离心发酵液,去除上层液体,用无菌水稀释菌体,混匀即为所需菌悬液。10 kg 菜园土加入菌悬液 1 L,每盘播种 50 粒黄瓜种子,黄瓜幼苗置于光照培养箱内,温度为 28 $^\circ\text{C}$,相对湿度为 65%,光周期为 12 h/12 h。第 4 天计算发芽势,第 7 天计算发芽率,待种子发芽结束后分别从各处理中选取 12 组发育基本一致的黄瓜幼苗,每组 5 株,培养 3 周,测量黄瓜茎粗、株高、鲜质量和干质量,并计算植株壮苗指数。

1.2.5 解钾菌对黄瓜产量及品质的影响 黄瓜幼苗移栽至口径为 50 cm、高为 35 cm 的花盆中,每盆定植 1 株,盆中装有经 2 次高压蒸汽灭菌的山区菜园土,试验于河北省石家庄鹿泉区河村温室大棚中进行。采用 1×10^8 CFU/mL 32-2 和 10013 菌悬液

灌根处理,用量为1 L/株,黄瓜生长期每2周处理1次,共处理9次,对照为清水灌根。测定黄瓜的果实横径、纵径、平均单果质量和单株产量以及可溶性糖、可溶性蛋白、维生素C、可溶性固形物含量。其中,可溶性固形物含量采用手持折光仪测定;可溶性糖含量采用蒽酮比色测定;可溶性蛋白含量采用考马斯亮蓝染色法测定;维生素C含量采用2,6-二氯酚酚滴定法^[11]测定。

1.3 数据统计与分析

数据采用 Excel 2010 进行处理,用 DPS 统计分析软件进行差异分析。

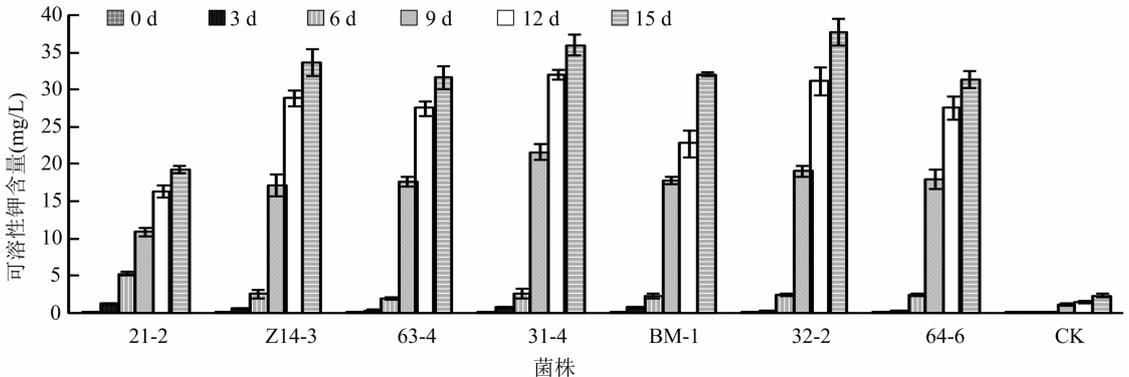


图1 不同解钾菌解钾能力测定

2.2 解钾菌 32-2 的鉴定

在解钾选择培养基上进行 32-2 菌株培养,48 h 观察菌落形态,该菌株菌落呈圆形、边缘整齐、透明凸起、表面湿润、菌落黏稠、菌落挑起时有弹性、可拉成丝。用显微镜观察菌体发现,该菌呈革兰氏阴性,菌体椭圆形,产生椭圆形芽孢和肥大的荚膜。由表 1 可以看出,对菌株 32-2 进行 16S rDNA 扩增得到 1 条 1 500 bp 左右的条带,将其测序后的序列信息提交给 NCBI,构建菌株系统发育进化树(图 2)。可以看出,32-2 与草木樨中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) strain ORS1044 (LMG 15285) 聚于同一个支上,序列相似性达 99%,结合形态观察和生理生化特性,32-2 初步鉴定为草木樨中华根瘤菌(*Sinorhizobium meliloti*) 菌株。

表 1 菌株 32-2 的生理生化特征

特征	结果	特征	结果
菌落形态	圆形透明	吡啶试验	-
菌体形态	椭圆形	甲基红试验	+
革兰氏染色	-	V-P 试验	-
淀粉水解试验	+	硝酸盐试验	+
明胶水解试验	+	接触酶	+
葡萄糖发酵试验	+	柠檬酸盐	-
乳糖发酵试验	+	H ₂ S 试验	+

注:“+”、“-”分别表示阳性、阴性。

2.3 解钾菌 32-2 对黄瓜种子和幼苗的促生效果

发芽势是指种子发芽达到高峰期的发芽率,是衡量种子发芽整齐程度的指标。由表 2 可知,在浓度为 1×10^8 CFU/mL 的 32-2 和 10013 处理下黄瓜

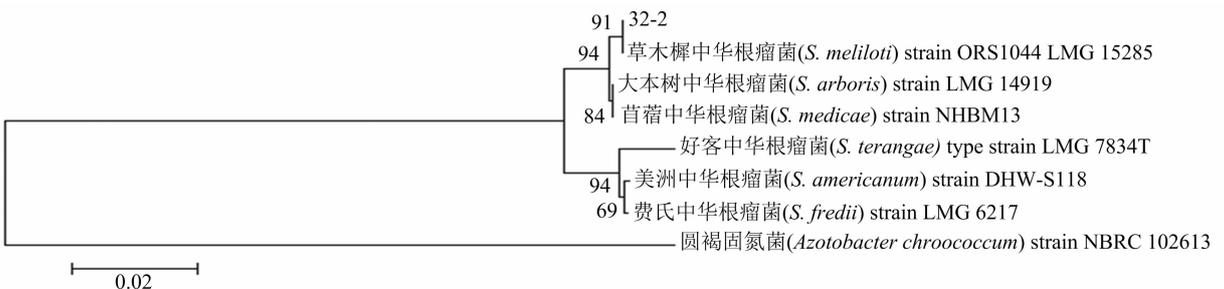


图2 基于 16S rDNA 序列菌株 32-2 的系统发育进化树

表2 黄瓜发芽率和发芽势

处理	发芽率(%)	发芽势(%)
32-2	88.00a	80.83a
10013	84.67b	74.86b
CK	74.67c	72.75b

注:同列数据后不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

发芽率均显著高于对照,而32-2处理的发芽率比

表3 解钾菌对黄瓜幼苗生长及质量的影响

基质	株高(cm)	茎粗(cm)	面积(cm ²)	鲜质量(g)		干质量(g)		壮苗指数	干质量根冠比	叶绿素含量(mg/g)	根系活力[$\mu\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h}),\text{FW}$]
				地上部	地下部	地上部	地下部				
32-2	13.17a	4.67a	84.56a	17.64a	1.47a	1.73a	0.14a	0.81a	0.081a	1.8a	33.98a
10013	11.53b	4.38a	83.89a	17.01a	1.33b	1.66b	0.12a	0.80a	0.072b	1.82a	25.16b
CK	11.37b	4.22a	82.75a	17.11a	1.29b	1.61b	0.12a	0.77b	0.074b	1.79a	24.53b

2.4 解钾菌对黄瓜产量及品质的影响

通过测量黄瓜果实横径、纵径、单果质量、产量发现,32-2处理后果实的横径、纵径、单果质量、产量均显著高于对照,而10013处理后的果实横径、产量分别与对照无显著差异。32-2产量比对照增产8.41%,而10013处理的黄瓜产量只比对照增产0.24%(表4)。通过测量黄瓜各项品质指标发现,32-2处理后黄瓜的可溶性固形物、可溶性糖、维生素C、可溶性蛋白含量均显著高于对照,而10013处理后的黄瓜品质各项指标与对照无显著性差异(表5)。

表4 解钾菌对黄瓜产量的影响

处理	果实横径(mm)	果实纵径(mm)	单果质量(g)	产量(t/hm ²)	增产率(%)
32-2	33.78a	348.15a	338.03a	135.88	8.50
10013	31.67b	327.23b	310.35b	125.13	0.29
CK	30.84b	329.28b	311.54c	124.77	

表5 解钾菌对黄瓜品质的影响

处理	可溶性固形物含量(%)	可溶性糖含量(mg/g)	维生素C含量(mg/g)	可溶性蛋白含量($\mu\text{g}/\text{g}$)
32-2	4.23a	0.185a	10.87a	7271.32a
10013	4.01b	0.183ab	7.54b	6198.44b
CK	3.96b	0.180b	7.59b	6014.39b

2.5 解钾菌对土壤养分状况的影响

施用菌株32-2和10013后种植黄瓜的土壤有机质和速效钾含量均有一定程度提高。可见,微生物菌剂对改善土壤养分具有较好的效果(表6)。

3 结论与讨论

本试验发酵条件是在实验室条件下应用摇瓶

10013处理的高出3.93%,发芽势高出7.97%。

由表3知,32-2处理的黄瓜幼苗,其株高、地下鲜质量、地上干质量、壮苗指数、干质量根冠比、根系活力等指标均显著高于对照,且该处理的黄瓜幼苗株高、地下鲜质量、地上干质量、干重根冠比、根系活力等指标也显著高于10013处理的黄瓜幼苗。

表6 黄瓜不同处理对土壤养分状况的影响

时间	处理	有机质含量(g/kg)	速效钾含量(mg/kg)	pH值
试验前		24.13	119	7.3
试验后	32-2	25.38	133	7.2
	10013	25.42	124	7.2
	CK	24.27	120	7.2

试验完成的,菌株如果应用到实际生产,还应综合考虑各方面因素,在保证菌株效果的前提下,选用廉价原料和合适的培养条件,使菌剂的生产效益最大化。吴凡等在对桑树根际解钾菌进行鉴定时,发现了2株具有较强解钾能力的根瘤菌(FK11和FK8)^[12]。有研究表明,接种根瘤菌对相思苗木的生长有显著的促进作用,并明显提高土壤有效钾的含量^[13]。张亮等通过液体培养试验研究了8株菜豆根瘤菌对土壤钾的活化作用。由此可知,根瘤菌除具有固氮能力,某些菌株还可以活化土壤中的无效钾,从而提高土壤钾的生物有效性,达到对植物促生的效果^[14]。本试验获得的高效解钾菌株32-2可高效分解钾矿石中的钾元素,发酵15d时发酵液中可溶性钾含量为37.77mg/L,是对照中可溶性钾含量的16.22倍。同时,对黄瓜有显著的促生作用,黄瓜幼苗浓度为 1×10^8 CFU/mL的32-2处理下发芽率均显著高于对照,且处理后的黄瓜幼苗株高。地下鲜质量、地上干质量、壮苗指数、干质量根冠比、根系活力等指标均显著高于对照,同时果实的产量和品质各项指标均显著高于对照。但是,中华草木樨根瘤菌32-2的解钾机制和促生机制还有待进一步研究。

徐铭阳,卢家森,耿翔,等.多菌灵降解菌 djl-6 和啮虫脘降解菌 D-2 液体菌剂的研发[J].江苏农业科学,2020,48(17):270-275.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.054

多菌灵降解菌 djl-6 和啮虫脘降解菌 D-2 液体菌剂的研发

徐铭阳¹,卢家森¹,耿翔²,刘卜郡¹,何健¹,黄星¹

(1.南京农业大学生命科学学院,江苏南京 210095; 2.江苏省南京市江宁区湖熟街道农业服务中心,江苏南京 211121)

摘要:以长期受多菌灵和啮虫脘农药污染的土壤中分离筛选得到的多菌灵降解菌株庆莹红球菌 (*Rhodococcus qingshengii* sp. nov.) djl-6 和啮虫脘降解菌株噬染料菌 (*Pigmentiphaga* sp.) D-2 为供试菌株,研究了降解菌菌剂的不同保存剂型与初步应用的情况。结果表明,2株降解菌均以苯甲酸钠作为防腐剂的处理效果最好,能维持活菌数较高且不产生杂菌污染。降解菌 djl-6 复配保护剂的最佳使用浓度:0.30% 柠檬酸钠、0.30% 羧甲基纤维素、0.20% CaCl₂。降解菌 D-2 复配保护剂的最佳使用浓度:0.20% 糊精、0.20% 柠檬酸钠、0.30% CaCl₂。与对照相比,添加保护剂后,菌株 djl-6、菌株 D-2 活菌数分别够提高 32.03%、38.70%。2株菌的液体菌剂保存 45 d 后,降解菌 djl-6 能够在 10 d 内将土壤 5 mg/kg 多菌灵降解 95.23%,降解菌 D-2 能够在 10 d 内将土壤 5 mg/kg 啮虫脘降解 92.75%,有效延长了液体菌剂的保存期。

关键词:多菌灵降解菌;啮虫脘降解菌;液体菌剂;保存条件

中图分类号: X172 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0270-06

设施农业作为农业现代化发展的重要产业越

来越受到各国政府的重视,设施农业不仅有效解决了我国淡季期间蔬菜短缺问题,还促进了居民传统消费结构的改变^[1]。但是设施农业中蔬菜病虫害较多,农药的使用率也相对较高,以多菌灵和啮虫脘为代表的农药因其高效低毒的特点^[2-4]而被广泛应用于设施农业之中。多菌灵是一种内吸性的广谱杀菌剂,土壤中残留的多菌灵会导致土壤微生物数量下降,抑制土壤脱氢酶、磷酸酶活性^[5-6]。啮虫脘是一种内吸杀虫剂,残留在土壤中会抑制土壤固

收稿日期:2019-10-27

基金项目:国家重点研发计划(编号:2016YFD0801102);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(18)1005];南京农业大学 SRT 项目(编号:1910C01)。

作者简介:徐铭阳(1995—),男,山东临沂人,硕士研究生,主要从事环境微生物学研究。E-mail:xumingyang0814@163.com。

通信作者:黄星,博士,教授,主要从事环境微生物学研究。E-mail:huangxing@njau.edu.cn。

参考文献:

- [1] 蒋先军,黄昭贤,谢德体,等.硅酸盐细菌代谢产物对植物生长的促进作用[J].西南农业大学学报,2000,22(2):116-119.
- [2] 别运清,胡正嘉.硅酸盐细菌几种功能的研究[J].襄樊职业技术学院学报,2002(1):12-15.
- [3] 吴洪生,陈佳宏,刘正柱,等.钾细菌制剂对土壤钾素的影响探讨[J].中国生态农业学报,2003,11(3):98-100.
- [4] 张红娟,张朝阳,聂刚.钾细菌对土壤养分活化作用的研究[J].杨凌职业技术学院学报,2005,4(3):4-6.
- [5] 郭勋斌,吴洪生,刘怀阿,等.钾细菌制剂对水稻生长发育的影响[J].江西农业大学学报,2001,23(3):447-449.
- [6] 吴洪生,郭勋斌,刘怀阿,等.钾细菌制剂在花生上的应用研究[J].广西农业生物科学,2003,22(2):119-121.
- [7] 薛智勇,汤江武,钱红,等.硅酸盐细菌在不同土壤中的解钾作

- 用及对甘薯的增产效果[J].土壤肥料,1996(2):23-26.
- [8] 那文志,徐凤花,鲍玉杰,等.硅酸盐菌剂的解钾作用及田间使用效果[J].生命科学仪器,2009,7(4):38-41.
- [9] 商照熙,刘刚,包剑.我国钾资源开发技术进展与展望[J].化肥工业,2012,39(4):5-8,49.
- [10] 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:b349-b384.
- [11] 蔡庆生.植物生理学实验[M].北京:中国农业大学出版社,2013.
- [12] 吴凡,刘训理,张楠,等.桑树根际硅酸盐细菌的分离鉴定及解钾能力测定[J].蚕业科学,2010,36(2):323-329.
- [13] 张慧,余永昌,黄宝灵,等.接种根瘤菌对直杆型大叶相思幼苗生长及土壤营养元素含量的影响[J].东北林业大学学报,2005,33(5):47-48,50.
- [14] 张亮,黄建国,韩玉竹,等.菜豆根瘤菌对土壤钾的活化作用[J].生态学报,2012,32(19):6016-6022.