

doi:10.11937/bfyy.20164683

黄瓜根际解钾细菌的分离筛选、鉴定及其促生效果

葛红莲, 纪秀娥

(周口师范学院 生命科学与农学院, 河南 周口 466001)

摘要:以黄瓜根际土壤为试材,采用亚历山大硅酸盐细菌培养基从黄瓜根际土壤中分离筛选解钾菌,用原子吸收法测定菌株的解钾能力,选出解钾能力较强的菌株进行菌种鉴定,同时研究其对黄瓜幼苗生长的影响。结果表明:从黄瓜根际土壤中共分离获得9株细菌,其中PK1、PK3和PK7具有较强的解钾能力,液体培养96 h后其解钾率分别为30.05%、33.78%和44.01%。依据菌株的形态学特征和生理生化特征鉴定,PK1和PK3为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),PK7为胶质类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)。盆栽试验结果表明,与对照相比,14 d后PK1提高黄瓜的根长、株高、鲜质量和干质量分别为42.60%、10.45%、48.65%、33.01%,PK3分别对应提高65.26%、21.09%、83.78%和49.48%,PK7分别对应提高79.46%、44.26%、105.41%和113.03%。

关键词:黄瓜;解钾细菌;根际;筛选;促生长

中图分类号:S 436.421.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)13-0021-05

钾是作物生长发育所必需的三大营养元素之一,钾参与植物的新陈代谢,如光合作用、蛋白质的合成、碳水化合物的代谢以及酶的活化等^[1-2],并且钾能提高植物的抗逆性和改善作物的品质^[3-4]。缺钾影响植物生长、根系发育以及抗逆性和抗病虫害的能力,进而造成作物产量低。目前,我国约有60%的耕地缺钾,但硅酸盐类矿物如钾

长石和云母等钾元素含量丰富,因其具有难溶性,钾元素很难释放出来^[5-6]。为了缓解土壤缺钾的状况,利用化肥补钾成为我国农业生产中普遍使用的方法,但长期使用化肥改变了土壤的理化性质,导致了土壤结构的破坏,造成养分流失和环境污染,制约了我国农业的可持续性发展^[7]。因此,需要寻求解决钾亏缺、生态环保的途径。许多研究表明解钾细菌能分解含钾矿物,将土壤中的无效钾、磷、硅等营养元素转化为速效养分,增加土壤中钾、磷、硅等元素的含量,促进作物生长发育,提高作物的产量和品质,有利于农业的可持续性发展^[8-10]。国内外学者已从一些重要的作物,如水稻、小麦、甘蔗、玉米和棉花等根际分离选育出许多优良促生菌株,并且部分菌株已用于商业化

第一作者简介:葛红莲(1976-),女,硕士,副教授,研究方向为微生物农药和微生物菌肥的开发与应用。E-mail:gehonglian2003@126.com.

基金项目:河南省科技厅科技攻关资助项目(162102310588);周口师范学院校本资助项目(ZKNUB215210)。

收稿日期:2017-02-27

2 121 bp and encoded a protein of 706 amino acids with predicted molecular mass of 78.36 kDa and a pI of 7.76. Both the results of NCBI Blastp and phylogenetic tree based on LecRK proteins showed that CsLecRK protein had the highest homology with that of muskmelon (95%), the evolutionary distance was the shortest. The result of qRT-PCR showed that *CsLecRK* was significantly down-regulated under Cu stress.

Keywords: cucumber; copper tolerance related gene; *CsLecRK*; expression analysis

菌肥生产,在农业生产中发挥着重要作用^[8-12]。尚海丽等^[13]研究发现用解钾细菌可提高玉米地上部分质量、根冠比和根系活力,并提高土壤中速效钾的含量。方华丹等^[14]研究发现,芽孢菌可提高水稻苗高、鲜质量和干质量以及植株全氮、全磷和全钾的含量。胡州等^[9]报道胶质芽孢杆菌 K1 和 K3 能分解土壤矿物,与对照相比,发酵液中可溶性钾含量分别增加了 48.16% 和 56.57%。黄瓜是目前我国设施生产中栽培面积较大的蔬菜作物之一,并且对钾素的吸收量较大。有研究表明钾素能影响黄瓜的品质、光合作用及抗逆性^[15]。该试验以黄瓜根际土壤为材料,采用亚历山大硅酸盐细菌培养基并利用原子吸收法从黄瓜根际土壤中分离筛选出解钾能力较强的菌株进行菌种鉴定,通过测定黄瓜幼苗的根长、株高、鲜质量和干质量研究解钾菌对黄瓜幼苗的促生作用,以期为微生物肥料的研发及推广应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土壤样品为河南省扶沟县日光大棚黄瓜根际土壤,装入无菌自封袋中,贴上标签,运回实验室进行解钾菌的分离。试验用培养基为亚历山大硅酸盐细菌培养基和牛肉膏蛋白胨培养基^[16]。供试黄瓜“津绿 3 号”购买于河南省周口市农业科学院。

1.2 试验方法

1.2.1 解钾细菌的分离和初筛

称量 10 g 黄瓜根际土样,放入装有 90 mL 无菌水且带有玻璃珠的 250 mL 锥形瓶中,28 ℃ 恒温振荡 30 min,制成土壤菌悬液,取 1 mL 土壤菌悬液 10 倍梯度稀释,取 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-3}$ 稀释度的土壤菌悬液 0.1 mL 涂布在亚历山大硅酸盐细菌培养基上,每个稀释度 3 次重复。28 ℃ 培养箱中培养 3~4 d,通过 D (解钾圈直径) 和 d (菌落直径) 比值初步筛选解钾能力较强的菌株。对具有明显透明圈的菌株进行纯化,直至通过平板观察和镜检确定其为纯培养物后,挑取单菌落转接到牛肉膏蛋白胨斜面培养基于 4 ℃ 保存。

1.2.2 解钾细菌解钾能力的测定

挑选初筛的解钾细菌菌落,接种到牛肉膏蛋白

胨固体培养基上进行培养,28 ℃ 恒温培养 4 d 后,用无菌水洗下菌体制成浓度为 1×10^8 CFU · mL⁻¹ 的菌悬液。参照文献^[8]的方法测定初筛菌的解钾活性。取 100 mL 解钾活性培养基于 250 mL 锥形瓶中,每瓶接入 5 mL 菌悬液(活菌数约为 1×10^8 CFU · mL⁻¹),对照组加入等量无菌水,每组设 3 次重复,28 ℃,160 r · min⁻¹ 摇床培养 7 d。取培养液,1 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,去粗渣,然后取 10 mL 菌液 10 000 r · min⁻¹ 离心 10 min,用原子吸收法^[17-18]测定发酵液中速效钾含量,与对照组进行比较,得出不同菌株解钾效率。速效钾增加量(%) = (试验组速效钾含量(mg · L⁻¹) - 对照组速效钾含量(mg · L⁻¹)) × 100 mL / (钾长石粉量(g) × 全钾含量(%)) × 100。

1.2.3 解钾细菌的鉴定

参照文献^[17]对解钾细菌进行菌种鉴定,鉴定内容包括菌株的培养特征,形态学观察、革兰氏染色、芽孢染色、荚膜染色以及菌种的生理生化测定。菌种的生理生化测定内容包括氧化酶、葡萄糖发酵试验、淀粉酶试验、V. P. 测定、接触酶反应、柠檬酸盐利用试验、吡啶试验、明胶液化试验和 M. R. 试验等。

1.2.4 解钾细菌对黄瓜幼苗的促生作用

挑选籽粒饱满的黄瓜种子,用体积分数为 75% 的酒精表面消毒 30 s,蒸馏水洗涤 3~4 遍,25 ℃ 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 300 mm × 200 mm × 50 mm 的托盘中,托盘中装有经 2 次高压蒸汽灭菌的菜园土,每托盘播种 30 粒黄瓜种子,3 d 后长出黄瓜幼苗,黄瓜幼苗置于光照培养箱内,温度为 28 ℃,相对湿度为 70%,光周期为 12/12 h。设置 3 种解钾细菌处理: A 浇灌浓度为 1×10^8 CFU · mL⁻¹ PK1 的菌悬液 30 mL; B 浇灌浓度为 1×10^8 CFU · mL⁻¹ PK3 的菌悬液 30 mL; C 浇灌浓度为 1×10^8 CFU · mL⁻¹ PK7 的菌悬液 30 mL; 以浇灌灭菌水作为对照。每处理 3 次重复,处理 14 d 后测定黄瓜的根长、株高、植株地上部鲜干质量。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 16.0 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 黄瓜根际土壤解钾细菌的筛选

从黄瓜根际土壤中分离出 9 株解钾细菌,分别命名 PK1、PK2、PK3、PK4、PK5、PK6、PK7、PK8 和 PK9。采用以钾长石粉为唯一钾源的培养基对 PK1~PK9 菌株的解钾能力进行初步测定。从表 1

表 1 不同菌株解钾能力用 Duncan's 新复极差法
测验的多重比较

Table 1 Multiple comparison of the extraction potassium ability of different bacteria strains by Duncan's multiple range test

菌株 Strain	D/d	P<0.05	P<0.01
PK1	5.67	c	C
PK2	2.00	h	F
PK3	8.29	b	B
PK4	1.18	h	F
PK5	2.12	gh	F
PK6	3.77	d	D
PK7	8.75	a	A
PK8	2.50	f	E
PK9	2.76	ef	E

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05),不同大写字母表示差异极显著(P<0.01)。下同。

Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference at 0.05 level; different capital letters indicate highly significant difference at 0.01 level. The same below.

可知,PK1~PK9 均具有一定的解钾能力,D/d 值为 1.18~8.75,其中 PK7 菌株的解钾圈最大,D/d 值达 8.75,其次是 PK3 和 PK1,D/d 值分别为 8.29 和 5.67,PK4 最小,D/d 值为 1.18。

2.2 解钾细菌速效钾产生能力分析

为了进一步确定 PK1~PK9 菌株的解钾活性,将 9 种菌接种到液体解钾活性培养基上,采用原子吸收法测定各菌株的解钾效能,测定结果如图 2 所示。结果表明,PK1~PK9 菌株均有解钾能力,培养 12 h 时,PK7 和 PK1 菌株的解钾率显著高于其它菌株(P<0.05)。随着培养时间的延长,菌株间解钾能力差异逐渐增大,其中 PK1、PK3 和 PK7 具有较高的解钾能力,液体培养 96 h 后,解钾率分别 30.05%、33.78%和 44.01%。

2.3 解钾细菌的鉴定

2.3.1 菌株的形态学特征

在钾长石粉为唯一钾源的选择培养基平板上进行菌落形态特征观察。PK1 和 PK3 菌落呈白色,表面光滑,不透明,边缘不规则。PK1 和 PK3 革兰氏染色阴性,无荚膜和芽孢,杆状。PK7 菌落圆形,凸起,光滑,边缘整齐,表面光滑,无色透明。PK7 革兰氏染色阴性,菌体杆状,两端钝圆,有荚膜,菌体中央产生椭圆形芽孢。

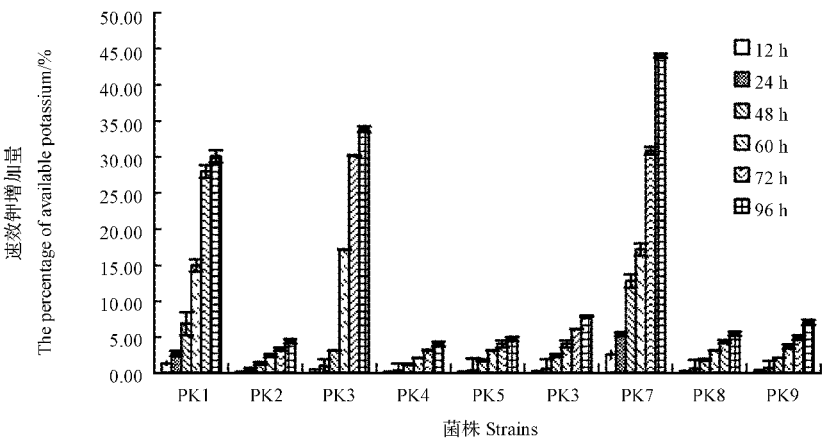


图 1 解钾细菌不同菌株的速效钾增加量百分比

Fig. 1 Increase in the percentage of available potassium of different strains of K solubilizing bacteria

2.3.2 菌株的生理生化特征

PK1、PK3 和 PK7 生理生化鉴定结果见表 2。根据 PK1、PK3 和 PK7 的菌株的形态学特征和生理生化特征,依据《伯杰氏细菌鉴定手册》^[18]可

知,PK1 和 PK3 为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),PK7 为胶质类芽胞杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*)。

表2 解钾细菌的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of potassium-releasing bacteria

试验项目 Test item	PK1	PK3	PK7
氧化酶试验 Oxydase test	—	—	—
葡萄糖发酵试验 Glucose ferment test	+	+	+
淀粉水解试验 Amylolysis	—	—	—
V. P 试验 V. P. test	—	—	+
接触酶反应 Catalase test	+	+	+
吲哚试验 Indole test	—	—	—
明胶液化试验 Gelatin liquefaction test	—	—	+
M. R. 试验 M. R. test	—	—	+
柠檬酸盐利用试验 Citrate utilization test	+	+	—
硝酸盐利用试验 Nitrate utilization test	+	+	+

注：“+”表示反应为阳性，“—”表示反应为阴性。

Note: ‘+’ indicates positive, ‘—’ indicates negative.

2.4 解钾细菌对黄瓜的促生作用

从表3可知,PK1、PK3和PK7处理黄瓜的根长、株高、鲜质量和干质量均高于对照($P < 0.05$)。PK7对黄瓜的促生效果最高,根长、株高、鲜质量和干质量分别比对照高79.46%、44.26%、105.41%和113.03%,PK3次之,分别比对照高65.26%、21.09%、83.78%和49.48%,PK1促生效果最低,分别比对照高42.60%、10.45%、48.65%、33.01%。

表3 解钾细菌对黄瓜生长的影响

Table 3 Effects of potassium-releasing bacteria on growth of cucumber seedlings

处理 Treatment	根长 Root length /cm	株高 Plant height /cm	鲜质量 Fresh weight /(g·株 ⁻¹)	干质量 Dry weight /(×10 ⁻³ g·株 ⁻¹)
CK	3.31±0.18d	10.62±0.16d	0.37±0.03d	32.54±2.48c
PK1	4.72±0.32c	11.73±0.22c	0.55±0.01c	43.28±3.23b
PK3	5.47±0.17b	12.86±0.33b	0.68±0.05b	48.64±2.46b
PK7	5.94±0.12a	15.32±0.22a	0.76±0.03a	69.32±5.24a

3 讨论与结论

一些微生物具有解钾能力,能够分泌有机酸分解钾长石、云母等硅酸盐类矿物和土壤中固态钾,把钾转化为速效钾溶解到土壤中,被植物直接吸收,促进植物的生长发育^[19-21]。目前研究的解钾菌主要包括芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)、固氮菌(*Azotobacter* sp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、伯克霍尔德菌(*Burkholderia* sp.)、克雷白

氏杆菌(*Klebsiella* sp.)、肠杆菌(*Enterobacter* sp.)、泛菌(*Pantoea* sp.)、香味菌(*Myroides* sp.)和农杆菌(*Agrobacterium* sp.)等^[19-22]。根际微生物具有适应环境能力强,定殖力高和对作物促生效果好的优点,因此从植物根际筛选功能性微生物成为人们研究的热点。一些研究已证明从植物根际更易筛选出解钾微生物^[2,5,7,9-10]。罗娜等^[2]从檀香根际筛选解钾细菌JT-K21使硅酸盐发酵液中可溶性钾含量达132.68 μg·mL⁻¹,张妙宜等^[5]从作物根际土壤筛选出解钾菌MY-1,使培养液中速效钾含量达到65.04 mg·L⁻¹。目前为止,从黄瓜根际分离解钾细菌的研究较少,为了筛选对黄瓜生境适应能力强,并且对黄瓜促生效果较好的菌株,该试验从河南省扶沟县大棚黄瓜根际土壤中筛选出解钾能力较强的菌株PK1、PK3、PK7。通过对菌种的初步鉴定,PK1与PK3为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*),PK7为胶质类芽孢杆菌(*Paenibacillus mucilaginosus*),这与罗娜等^[2]、胡州等^[9]的研究结果一致,均证明恶臭假单胞菌(*P. putida*)和胶质类芽孢杆菌(*P. mucilaginosus*)具有解钾能力。

解钾菌能作为微生物菌肥促进植物的生长^[9-12,14,21]。张玉花等^[21]研究表明具有解钾能力的胶质类芽孢杆菌和荧光假单胞菌促进樟子松幼苗的生长,提高植株对养分钾、磷和氮的吸收。张成省等^[22]证明从烟草根际筛选出的XF11具有较高的解钾活性,并且对烟草的株高和叶长有明显的促进作用,解钾菌处理烟草幼苗20 d后,株高和叶长分别增加38.64%和31.02%。该研究筛选出的菌株PK1、PK3、PK7促进了黄瓜幼苗的生长,其中PK7菌株促进效果最高,与对照相比,明显提高了黄瓜幼苗的株高、根长、鲜干质量,PK3菌株促生效果次之,PK1菌株促生效果最低。菌株促生能力的大小与解钾能力有关,在解钾能力测试中,PK7的解钾能力最强,PK3次之,PK1最低,这与菌株的促生能力相一致。然而,党雯等^[11]等研究表明解钾菌不但具有转化固态钾的能力,同时还可以分泌植物促生物质。该研究盆栽试验表明PK1、PK3、PK7对黄瓜的促生作用,是解钾作用,还是产生其它促生物质,还是二者共同作用,有待进一步研究。

参考文献

- [1] 常蕊,苗丽,贺超兴,等.施钾对亚适宜温光环境下黄瓜幼苗生长和生理特性的影响[J].中国蔬菜,2016(6):47-53.
- [2] 罗娜,周德明,徐睿,等.降香黄檀、檀香根际解钾菌的筛选与活性研究[J].热带作物学报,2016,37(5):964-970.
- [3] 陈凤真.钾对黄瓜根系保护酶和光合特性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(7):127-132.
- [4] 王意琼,刘会玲,王艳群,等.钾对不同基因型玉米生长、体内钾循环和分配的影响[J].植物营养与肥料学报,2013,19(4):773-780.
- [5] 张妙宜,陈宇丰,周登博,等.蓖麻根际土壤解钾菌的筛选鉴定及发酵条件的优化[J].热带作物学报,2016,37(12):2268-2275.
- [6] 伍善东,雷平,郭照辉,等.1株高效解钾菌的分离、鉴定及培养条件优化[J].贵州农业科学,2016,44(5):77-80.
- [7] 王金昌,郑国华,傅筱冲.一株解钾解磷菌株的筛选[J].江西科学,2014,32(1):51-53,103.
- [8] 陈易,程永毅,郭涛,等.一株具紫色土亲和性解钾菌的筛选及促生效应[J].西南大学学报(自然科学版),2016,38(5):58-65.
- [9] 胡洲,吴毅歆,毛自朝,等.硅酸盐细菌的分离、鉴定及其生物学特性研究[J].江西农业大学学报,2013,35(3):609-614.
- [10] 万兵兵,刘晔,吴越,等.烟草根际解磷解钾菌的筛选鉴定及应用效果研究[J].河南农业科学,2016,45(9):46-51.
- [11] 党雯,郝春花,张强,等.解钾菌的研究进展及其在农业生产中的应用[J].山东农业科学,2014,42(8):921-924.
- [12] ZHANG C,KONG F. Isolation and identification of potassium-solubilizing bacteria from tobacco rhizospheric soil and their effect on tobacco plants[J]. Applied Soil Ecology,2014,82:18-25.
- [13] 尚海丽,毕银丽,彭苏萍,等.解钾细菌与黏土矿物协同促进玉米生长提高土壤养分有效性[J].农业工程学报,2016,32(12):129-135.
- [14] 方华舟,左雪枝.稻田固氮解磷解钾菌筛选及其复合菌剂对土壤培肥作用[J].中国土壤与肥料,2014(2):82-85.
- [15] 张淑霞,宋云云,刘素芹,等.嫁接与施肥对黄瓜产量及钾吸收利用效率的影响[J].山东农业科学,2015,47(5):75-77.
- [16] 任建国,王俊丽.太子参土壤固氮菌与解钾菌的分离、筛选及鉴定[J].西南师范大学学报(自然科学版),2015,40(2):59-65.
- [17] 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.
- [18] BUCHANAN R E,GIBBONS N E.《伯杰氏细菌鉴定手册》[M].8版.北京:科学出版社,1984.
- [19] 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,2014,33(2):381-388.
- [20] 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.
- [21] 张玉花,彩花,王一超,等.高效解磷钾细菌与褐环乳牛肝菌共接种对樟子松幼苗的促生作用[J].农业产品加工,2014(6):41-43.
- [22] 张成省,陈雪,张玉芹,等.烟草根际土壤中解钾细菌的分离与多样性分析[J].中国生态农业学报,2013,21(6):737-743.

Screening, Identification and Promoting Effects of Potassium-solubilizing Bacteria in Rhizosphere of Cucumber

GE Honglian, JI Xiu'e

(College of Life Science and Agronomy, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466001)

Abstract: Rhizosphere soil of cucumber was used as test material, K solubilizing bacteria were isolated in Alexandrova medium. The ability of dissolving potassium of K solubilizing bacteria were determined with the atomic absorption spectrophotometer, then the strains with stronger K solubilizing bacteria were identified, meanwhile, the effects on the growth of cucumber seedling were studied. The results showed that nine K solubilizing bacterium strains were isolated from cucumber rhizosphere soil, in which PK1, PK3 and PK7 demonstrated strong potassium decomposing ability, and potassium decomposing rate of them cultivated in liquid medium for 96 hour was 30.05%, 33.78% and 44.01%, respectively. Based on the morphological and physiological and biochemical characteristics, PK1 and PK3 were identified into *Pseudomonas putida*, PK7 was *Paenibacillus mucilaginosus*. In pot experiment, after 14 days PK1 increased the root length, plant height as well as fresh weight and dry weight of cucumber seedling by 42.60%, 10.45%, 48.65% and 33.01%, PK3 increased the correspondents by 65.26%, 21.09%, 83.78% and 49.48%, and PK7 increased the correspondents by 79.46%, 44.26%, 105.41% and 113.03%, respectively, compared with the control.

Keywords: cucumber; K-solubilizing bacteria; rhizosphere; screening; growth promotion