

不同土壤中硅酸盐细菌生理生化特征及其解钾活性的研究

何琳燕 盛下放 陆光祥 黄为一

(南京农业大学生命科学学院微生物学系 南京 210095)

摘 要 在以钾长石粉为唯一 K 源的硅酸盐细菌选择性培养基上,从我国部分省市土壤中筛选到 16 株硅酸盐细菌,以本实验室保藏 NBT 菌株为参照,对其生理生化特性、耐盐性、抗生素抗性、温度敏感性及释 K 能力等生物学特性进行了测定。结果表明,17 株硅酸盐细菌菌体均为杆状,产生椭圆至圆形芽胞。其中 SB6、SB13 为短杆状,SB4、SB6、SB10、SB15 菌株是 G⁺,其余菌株是 G⁻。NH₄⁺、NO₃⁻为良好 N 源,且能在无 N 培养基上生长。菌株 SB13 和 NBT 解 K 能力较强,释放的 K 比接灭活菌对照分别增加 49.1 %和 45.3 %。菌株 SB2、SB4、SB5、SB6 在 20 g/L NaCl 浓度的培养基上能生长,在温度为 10 ~ 40 范围内供试硅酸盐细菌能够良好生长。

关键词 硅酸盐细菌;生理生化特征;解钾;生物学特性

中图分类号 Q93;S1

硅酸盐细菌是土壤中一种重要功能菌,能活化土壤中的多种营养元素(K、Si、P等)供作物吸收利用^[1]。大量田间应用实验表现出了提高土壤中速效 K、P 含量,提高作物产量和品质等多种效应^[2、3],但也有研究指出应用效果的不稳定性^[4]。硅酸盐细菌解 K 作用是受多种因素制约的,使其功能发挥的前提条件是要筛选出优良的菌株^[5]。盛下放等研究发现土壤中不同微生物的解 K 效能不同,虽然硅酸盐细菌分布广泛,但是分离菌株中仅有 15%左右菌株具有较显著的释 K 能力,认为要使硅酸盐细菌充分发挥高效、稳定的解 K 功能,首先必须筛选出高效、稳定的释 K 菌株^[5]。本研究对来源于全国部分省市 17 个土壤样品中的硅酸盐细菌,测定其形态、生理生化特征、解 K 效能和其他生物学特性,以探究硅酸盐细菌资源多样性,为硅酸盐细菌在我国不同土壤生态系统中资源保护、开发和利用等提供理论和应用基础。

1 材料与方法

1.1 样品来源

样品采集地见表 1,采集 0~10 cm 的土壤样品,保存于无菌纸袋中带回实验室分离、筛选。硅酸盐细菌 NBT 菌株,本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 硅酸盐细菌的分离、纯化 采用硅酸盐细

表 1 菌株来源
Table 1 Sources of stains

菌株	分离地	生境
SB1	广西都安	水稻土
SB2	福建晋江	棉花地
SB3	陕西西安	森林土
SB4	辽宁抚顺	花园土
SB5	湖南衡阳	水稻土
SB6	江苏南京	垃圾土
SB7	江苏盐城	潮盐土
SB10	江苏泰兴	沙土
SB11	江苏盐城	大豆地
SB12	常熟海虞	岩石土
SB13	无锡北塘	甘蔗地
SB14	江苏盐城	小麦地
SB15	江苏南京	森林土
SB16	广西都安	垃圾土
SB17	广西都安	玉米地
NBT	江苏南京	草地
SB19	河北老河口	果园土

菌培养基^[6]分离纯化硅酸盐细菌,其中的土壤矿物用等量的水洗阴干钾长石粉代替,挑取单菌落转接斜面培养,4℃保存。

1.2.2 形态结构观察及生理生化试验 参照文献^[6]在硅酸盐细菌培养基上观察菌落形态,采用 Gram 染色法光学显微镜下观察菌体形态。以硅酸盐

细菌培养基为基础, 对供试菌株进行淀粉水解等生理生化特性测定。

1.2.3 解 K 试验 参照文献[5]进行摇瓶解 K 试验。每 250 ml 三角瓶中加入钾长石 0.1g 和缺 K 培养基 50 ml, 在 121 °C 灭菌 20 min, 然后接入菌悬液 3 ml, 对照接等量灭活菌液和不加菌液, 28 °C 振荡培养 5 天, 取发酵液用 60 g/L 的稀 H₂O₂ 消煮、过滤、定容、原子吸收分光光度法测 K。

1.2.4 其他生物学特性 分别配制含有不同浓度的不同抗生素、不同盐浓度(NaCl 浓度分别为 1.0、5.0、10.0、20.0 g/L)、酸碱(pH 4 ~ 11)的硅酸盐细菌培养基, 用供试硅酸盐细菌菌株点样, 培养 3 天后观察菌落的生长情况, 测定菌株对抗生素的敏感性、耐盐性、耐酸碱性。用供试菌株在硅酸盐细菌培养基平板上点样, 在不同温度(4 ~ 55 °C)下培养 3 天后, 观察菌株的生长情况, 测定其生长温度

范围。

2 结果与分析

2.1 硅酸盐细菌的形态特征

供试 17 株硅酸盐细菌菌体均为杆状, 其中 SB6、SB13 为短杆状。SB4、SB6、SB10、SB15 菌株是 G⁺, 其余菌株是 G⁻, 均产生椭圆至圆形芽胞。硅酸盐细菌培养基上的菌落边缘整齐、凸起、圆形、无色透明。

2.2 生理生化特征

表 2 可见, 供试 17 株硅酸盐细菌均能在蔗糖、葡萄糖、麦芽糖、甘露醇为 C 源的培养基上生长; NH₄⁺、NO₃⁻ 为良好 N 源, 且能在无 N 培养基上生长; 在无机 P 培养基上所有分离菌株都可以生长, 但没有观察到解 P 圈。

表 2 供试硅酸盐细菌的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of silicate-dissolving bacteria

生理生化特征	菌株																
	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7	SB10	SB11	SB12	SB13	SB14	SB15	SB16	SB17	NBT	SB19
淀粉水解试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甲基红试验	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
V-P 试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐试验	+-	-	+-	+	+-	+	+	-	-	-	-	+-	-	+	+	+	+-
糖发酵试验																	
葡萄糖	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
甘露醇	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
木糖	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
明胶液化试验	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
石蕊牛奶试验	b	bcd	g	g	g	bc	bc	g	g	b	bcd	b	b	g	g	bc	g
吡啶试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
脲酶试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
色氨酸脱氨酶试验	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: +: 阳性反应; -: 阴性反应; + -: 不反应; : 产气; b: 还原; c: 胨化; d: 酶凝; g: 不变色。

2.3 解 K 试验

对 17 株硅酸盐细菌的解 K 作用进行了研究。图 1 结果表明, NBT 接种含钾长石的缺 K 培养基培养 5 天后溶液中的 K 为 57.70 mg/L, 比接灭活菌对照增加 45.3 %; 而菌株 SB13 释放的 K 为 48.18 mg/L, 比接灭活菌对照增加 49.1 %, 比较溶液中 K 增加率认为 SB13 解 K 能力最强, NBT 次之。菌株 SB2、SB6、SB15 解 K 能力最弱, 释放的 K 比接灭活菌对照仅增加 8.4 % ~ 9.9 %。解 K 能力较高的

SB13 和 NBT 菌株的形态、生理生化特征也有差别, SB13 为短杆状, NBT 为长杆状; NBT 利用柠檬酸盐产碱而 SB13 菌株不能利用柠檬酸盐; 木糖发酵试验 NBT 既不产酸也不产气而 SB13 产酸; 在石蕊牛奶试验中, SB13 能使石蕊牛奶还原、胨化、酸凝, 而 NBT 仅使石蕊牛奶被还原胨化(表 2)。

2.4 其他生物学特性

2.4.1 对抗生素的敏感试验 由表 3 可知, 供试 17 株硅酸盐细菌对供试抗生素较为敏感。

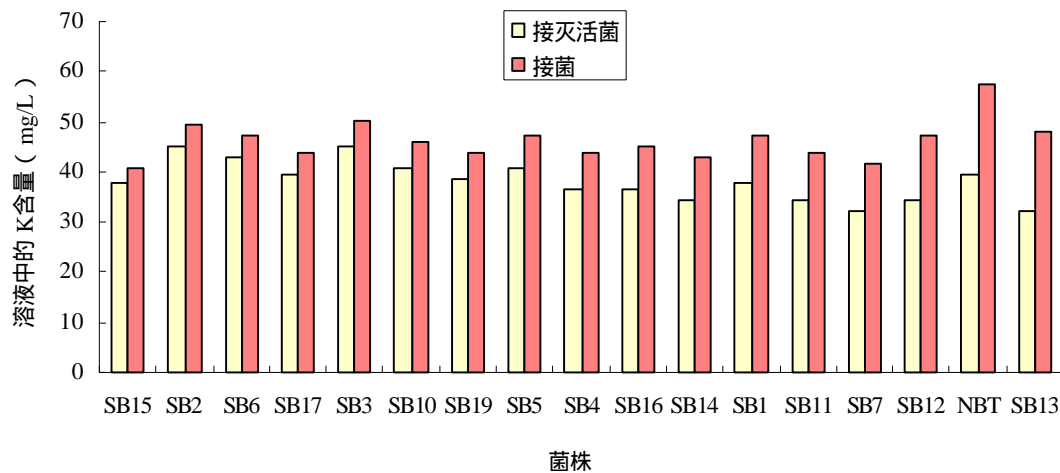


图 1 不同硅酸盐细菌解 K 效能的比较

Fig. 1 Effect of different strains on potassium release

表 3 硅酸盐细菌对不同抗生素的敏感性

Table 3 Sensitivity of silicate-dissolving bacteria to different antibiotics

抗生素	菌株																
	SB1	SB2	SB3	SB4	SB5	SB6	SB7	SB10	SB11	SB12	SB13	SB14	SB15	SB16	SB17	NBT	SB19
利福平 (10 µg/ml)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
氨苄青霉素 (20 µg/ml)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
卡那霉素 (5 µg/ml)	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
链霉素 (25 µg/ml)	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
四环素 (30 µg/ml)	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

注：+：生长；-：不长。

2.4.2 耐盐性试验 供试硅酸盐细菌在 NaCl 浓度为 0.1 ~ 5.0 g/L 的硅酸盐培养基上能够生长。菌株 SB2、SB4、SB5、SB6 在 20.0 g/L NaCl 浓度仍能生长，菌株 SB7 耐盐能力最低，5.0 g/L NaCl 浓度即不生长。

2.4.3 耐酸碱试验 试验结果表明，耐酸能力较强的菌株有 SB6、SB7、SB13、NBT，pH 4.5 时生长，而且 NBT 菌株 pH 4.0 时也能生长；耐碱能力较强的菌株有 SB1、2、4、6、7、10、11、13、15、17、NBT，这些菌株可以在 pH 11.0 生长。总的来说，硅酸盐细菌在 pH 5.0 ~ 9.0 可以生长，最适 pH 范围在 7.0 左右。

2.4.4 耐热性试验 供试硅酸盐细菌在温度范围 10 ~ 40 都可以生长。菌株 SB7 在较低温 4 能生长，但生长缓慢；SB2、SB7、NBT 菌株能在 50 高温下生长。

3 讨论

陈廷伟、陈华癸等^[7]发现，硅酸盐细菌在我国分布很广，各地土壤中经常发现，且分离菌株的形态差异不大。贺积强等^[8]对 40 株来自紫色土的硅酸盐细菌进行了包括形态、生理生化特征等 52 个表型性状的测试，认为硅酸盐细菌在表型特征上存在多样性，主要是胶冻样芽孢杆菌，其余菌株可能是新种。本试验在 16 个不同生境土壤样品中分离纯化得到 16 株硅酸盐细菌，与 NBT 菌株相比，这些菌株在硅酸盐细菌培养基和无 N 培养基上的菌落、菌体形态与陈华癸等描述基本一致，生理生化特性有差异，说明硅酸盐细菌在土壤中广泛存在，具有一定的生物多样性。

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)^[5]。人们发现硅酸盐细菌具有较显著解K溶P作用的菌株仅占15%~29%^[5]。本试验中供试硅酸盐细菌有一定的解K能力,不同的菌株解K能力存在差异。因此,从我国丰富的硅酸盐细菌资源中筛选出解K溶P菌株并进行人工诱变获得高效解K溶P并具有较强抗逆性的硅酸盐细菌菌株就具有重要的理论与实际意义。

参考文献

- 1 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探. 土壤学报, 2002, 39 (6): 863 ~ 871
- 2 盛下放, 黄为一, 殷永娴. 硅酸盐细菌的解钾作用及对棉花的增产效果. 土壤, 2001, 33 (3): 163 ~ 165
- 3 Zahra MK, Moni M, Abdel-AL SI. Significance of soil inoculation with silicate bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, 1984, 139 (5): 349 ~ 357
- 4 陆引罡, 钱晓刚, 龙键. 硅酸盐细菌对含钾矿物的解钾作用. 贵州农业科学, 1999, 27 (3): 26 ~ 28
- 5 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): 637 ~ 677
- 6 中国科学院南京土壤研究所微生物实验室编著. 土壤微生物研究法. 北京: 科学出版社, 1985, 51 ~ 57
- 7 陈廷伟, 陈华葵. 钾细菌的形态生理及其对磷钾矿物的分解能力. 微生物, 1960, (2): 104 ~ 112
- 8 贺积强, 李登煜, 张小平, 陈强, 梁如玉. 紫色土硅酸盐细菌的表型特征及溶磷解钾能力. 应用与环境生物学报, 2003, 9 (1): 71 ~ 77

PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SILICATE-DISSOLVING BACTERIA IN DIFFERENT SOILS AND THEIR CAPACITIES OF RELEASING POTASSIUM

HE Lin-yan SHENG Xia-fang LU Guang-xiang HUANG Wei-yi

(Department of Microbiology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract Cultured on selective medium based on feldspar as its sole potassium source, 17 strains of silicate-dissolving bacteria were screened out of soils sampled from several provinces in China. Their physiological and biochemical characters, salt tolerance, antibiotic resistance, temperature sensitivity and K releasing capability were determined. The results show that all strains appear as rods and yield ellipsoidal spores, but Strains SB6 and SB13 are shorter. The Gram reaction of Strains SB4, SB6, SB10 and SB15 were positive and the others negative. The isolates grew well with NH_4^+ and NO_3^- as nitrogen source and survived without. The strains were compared in capability of releasing potassium and it was found that Strain SB13 and NBT were more capable of releasing potassium. The content of soluble potassium was increased by 49.1% and 45.3%, respectively. Strains SB2, SB4, SB5 and SB6 survived in the medium with 20.0 g/L NaCl and were growing well under the temperature ranging from 10 ~ 40 °C.

Key words Silicate-dissolving bacteria, Physiological and biochemical character, Potassium-releasing. Biological feature