

解钾菌解钾效率检测方法的比较

王珣珏 黄巧云 蔡 鹏 陈雯莉

华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以中慢生根瘤菌 S-15 和类芽胞杆菌 S-17 作为供试菌株, 采用细胞破碎、 NH_4OAc 浸提、 H_2O_2 溶液消煮及不作任何前处理等 4 种方法, 利用火焰光度计检测解钾菌发酵液中 K^+ 含量, 并计算解钾菌在培养基中的解钾效率。结果表明, 配制的 3 种钾系列标准溶液所绘制的钾标准曲线较为接近, R^2 分别高达 0.994 4、0.999 7、0.999 8。采用 H_2O_2 消煮后所测得的 K^+ 浓度最高, 2 株解钾菌的解钾效率分别达到 101.1%、125.1%, 与其他处理组之间有显著性差异。用 H_2O_2 溶液处理所得到的解钾率更能真实反映解钾菌的解钾作用。

关键词 解钾菌; 解钾效率; 钾离子; 生物钾肥; 前处理方法; 检测方法

中图分类号 S 154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)01-0081-05

钾是作物所需的三大基本营养元素之一, 可促进作物生长发育, 提高粮食品质, 增强作物的抗病性、抗逆性等^[1]。由于我国可直接利用的钾资源匮乏, 且分布不均, 严重制约钾肥的生产和使用, 近年来我国钾肥进口比例也在不断攀升。生物钾肥是一种微生物肥料, 可以溶解土壤中的硅酸盐矿物, 释放出可溶性的钾供植物吸收利用, 相比化学肥料, 生物钾肥技术新、成本低、污染小, 是如今研究的热点, 具有较好的应用前景^[2]。

研发生物钾肥的前提条件是要筛选出能够高效溶解硅酸盐矿物的菌株。然而, 关于细菌培养液中 K^+ 浓度的测定方法比较多, 也比较杂乱^[1,3-5]。易浪波等^[1]将钾长石分解菌发酵液振荡离心后直接用电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)测定发酵液中钾含量; 连宾^[3]将硅酸盐细菌培养液搅拌、热水浴后过滤, 取滤液测水溶性钾的含量; 郑传进等^[4]、李玉梅等^[5]将细菌培养液用 6% H_2O_2 处理后过滤, 取滤液在火焰光度计上测水溶性钾含量。目前, 没有一种明确统一的检测细菌培养液中 K^+ 浓度变化的方法。本研究采用不同前处理方法检测细菌在培养基中的解钾效率, 旨在通过比较确定能合理评估解钾菌解钾作用的检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium* sp.) S-15 和类芽胞杆菌 (*Paenibacillus* sp.) S-17 为笔者所在实验室筛选的高效钾长石溶解菌。

1.2 矿物材料

钾长石矿物样品购自中国地质大学(武汉)。将钾长石研磨、过筛, 收集粒径 0.075~0.15 mm 的矿粉颗粒, 用超纯水进行超声波清洗后, 再用 20% 盐酸溶液淋洗, 洗去矿粉中可溶性离子, 最后用超纯水进行超声波清洗若干次, 直至溶液呈中性, 烘干备用。

1.3 培养基及溶液

有氮液体培养基 (g/L): 蔗糖 10.0, K_2HPO_4 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.1, 酵母粉 0.5, pH 7.2~7.4。115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

缺钾液体培养基 (g/L): 蔗糖 10.0, Na_2HPO_4 2.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.1, 酵母粉 0.5, 钾长石粉 10.0, pH 7.2~7.4。115 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1 mol/L 中性 NH_4OAc 溶液: 称取化学纯

收稿日期: 2015-09-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2015CB150504); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(IRT1247); 中央高校基本科研业务费专项(2662015PY016, 2013PY111, 2013PY136)

王珣珏, 硕士研究生, 研究方向: 土壤与环境微生物. E-mail: xzy2988970@163.com

通信作者: 陈雯莉, 博士, 教授, 研究方向: 土壤与环境微生物. E-mail: wlchen@mail.hzau.edu.cn

$\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 77.09 g 加水稀释,定容至近 1 L。用 HOAc 或 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 调至 pH 7.0,然后稀释至 1 L。

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钾标准贮备溶液:称取 KCl (分析纯,110 $^\circ\text{C}$ 烘干 2 h)0.190 7 g 溶于不加钾长石粉的缺钾培养基或无菌去离子水或 1 mol/L NH_4OAc 溶液中,定容至 1 L,即为含 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钾标准贮备液。

钾系列标准溶液:分别准确吸取 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钾标准贮备液 0、2.5、5.0、10.0、15.0、20.0 mL 放入 100 mL 容量瓶中,用不加钾长石粉的缺钾培养基或无菌去离子水或 1 mol/L NH_4OAc 溶液定容,即得 0、2.5、5、10、15、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 钾系列标准溶液。

1.4 方法与步骤

1)钾标准曲线的绘制。将配制好的钾标准系列溶液,以含 K 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的钾标准液调火焰光度计上检流计读数为 0,以质量浓度最大的一个调火焰光度计上检流计为满度(100),然后从稀到浓依次进行测定,记录检流计的读数。以检流计读数为纵坐标,钾的质量浓度为横坐标,绘制标准曲线。

2)细菌的培养。将 -80 $^\circ\text{C}$ 保藏的中慢生根瘤菌 S-15 和类芽胞杆菌 S-17 在有氮液体培养基中活化 48 h,离心后弃上清,用无菌水将菌体细胞清洗 2 次(洗去培养基),收集菌体用无菌水将菌体悬浮,制备菌悬液(D_{600} 约为 0.5)。接种 5 mL 菌悬液于装有 95 mL 缺钾培养基(含钾长石粉 1 g)的 250 mL 三角瓶中,以加入同体积的无菌水作为空白对照,在 28 $^\circ\text{C}$ 、180 r/min 的条件下振荡培养 7 d。培养液经不同处理后在火焰光度计上测定溶液中 K^+ 浓度。

3)不经前处理直接测钾。将培养 7 d 的细菌培养液于 5 000 r/min 离心 10 min,取上清直接在火焰光度计上测定 K^+ 浓度。钾标准溶液用不加钾长石粉的缺钾培养基配制。

4)培养基经 H_2O_2 处理后测钾。对刘五星等^[6]检测解钾菌培养液中 K^+ 浓度的方法进行改进:取细菌培养液 10 mL,加入 2 mL 6% H_2O_2 ,在沸水浴中消化 1 h,取消液 13 000 r/min 离心 5 min,取上清在火焰光度计上测定 K^+ 浓度。钾标准溶液用不加钾长石粉的缺钾培养基配制。

5)细胞破碎后测钾。取 1.5 mL 细菌培养液 5 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液测溶液中 K^+ 浓度(钾标准溶液用不加钾长石粉的缺钾培养基配制)。菌体经自然干燥,用 1.5 mL 无菌去离子水重悬,放入 FastPrep-24 中破碎细胞(5 m/s, 60 s,

3 次),破碎后溶液 13 000 r/min 离心 5 min,取上清用火焰光度计测菌体钾含量(钾标准溶液用无菌去离子水配制)。

6) NH_4OAc 浸提后测钾。根据 NH_4OAc 浸提土壤胶体上 K^+ 的基本原理^[7],检测解钾菌菌体表面吸附 K^+ 的含量。取 30 mL 培养液于 50 mL 离心管中,7 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液测溶液中 K^+ 浓度。菌体经自然干燥,加入 1 mol/L NH_4OAc 溶液 30 mL,振荡 30 min,13 000 r/min 离心 5 min,取上清用火焰光度计测菌体吸附钾含量。钾标准溶液用 1 mol/L NH_4OAc 配制。

2 结果与分析

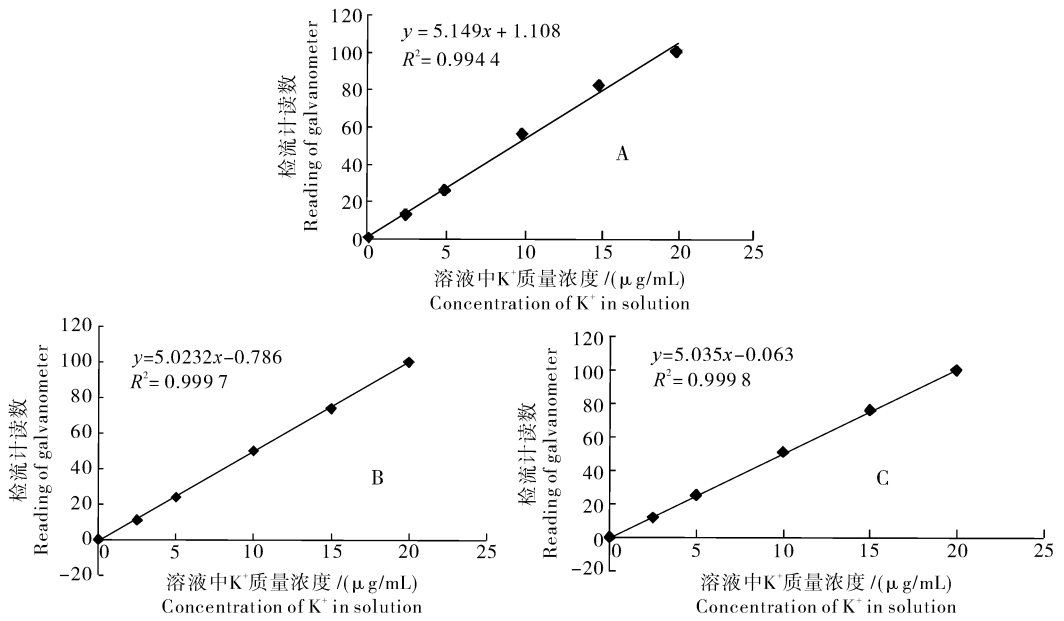
2.1 3 种钾系列标准液制成钾标准曲线的比较

为了抵消溶液组成(包括酸、碱和阴、阳离子的浓度)的改变对钾测定结果的影响,使待测液和标准液组成基本相同,分别配制了 3 种钾系列标准溶液。由图 1 可看出,用不加钾长石粉的缺钾培养基、无菌去离子水和 1 mol/L NH_4OAc 溶液配制的钾系列标准液,检流计读数较为接近,而且拟合出的一元线性回归方程均呈现极显著相关性, R^2 分别达到 0.994 4、0.999 7、0.999 8。说明采用不同的溶液配制钾系列标准溶液对钾的测定没有太大影响。

2.2 不同处理方法测得 K^+ 质量浓度结果的比较

测定结果表明,细菌培养液经过不同处理后测得的溶液中 K^+ 质量浓度有一定差异(表 1)。细菌培养 7 d 后,培养液经离心后直接测得的 K^+ 质量浓度均较低,中慢生根瘤菌 S-15 和类芽胞杆菌 S-17 培养液中 K^+ 质量浓度分别为 8.09 ± 0.59 、 8.87 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而不接菌的对照组中 K^+ 质量浓度也仅为 6.54 ± 0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$,接菌组的解钾效果不明显。此方法测得的钾是细菌培养液中游离态的 K^+ 。培养液经 6% H_2O_2 消化后测得的溶液中 K^+ 质量浓度是最高的。中慢生根瘤菌 S-15 和类芽胞杆菌 S-17 培养液中 K^+ 质量浓度高达 45.57 ± 4.09 、 51.01 ± 3.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$;不接菌对照组的 K^+ 质量浓度相较于不进行前处理的 K^+ 质量浓度也有升高,原因可能是: H_2O_2 的消化对钾长石有一定的溶解作用;中慢生根瘤菌 S-15 和类芽胞杆菌 S-17 均产荚膜,荚膜具有粘附作用,可以吸附矿物释放的 K^+ ;培养液经 6% H_2O_2 溶液高温消煮后,细菌荚膜被氧化分解,荚膜吸附的 K^+ 被释放出来。

解钾菌在溶解钾长石的过程中可能会吸收利用



A:不加钾长石粉的缺钾培养基; B:去离子水; C:1 mol/L NH₄OAc 溶液。A: K⁺ limited medium without feldspar powder.B:Deionized water.C:1 mol/L NH₄OAc solution.

图 1 不同溶液中的钾标准曲线

Fig.1 Standard curves of K in different solutions

溶液中的 K⁺。将细菌细胞经 FastPrep-24 仪器破碎,使细胞中的 K⁺ 释放出来; 2 种细菌细胞内钾含量均为 0 μg/mL, K⁺ 总量与不经前处理所测得的结果一致,并没有发现解钾菌细胞内吸收了钾离子,用 NH₄OAc 浸提法置换细菌细胞表面的钾离子以检

测解钾菌菌体表面吸附 K⁺ 的含量,结果表明, NH₄OAc 可以交换出细菌表面的钾离子,但含量较低,2 种菌体吸附的钾含量分别是 2.13 ± 1.00、0.54 ± 0.12 μg/mL,中慢生根瘤菌 S-15 吸附量比类芽胞杆菌 S-17 多。

表 1 不同前处理方法得到的钾含量(均值 ± 标准差)

Table 1 Determination results of K concentration (Mean ± SD) with four different pre-treatment methods

前处理方法 Pre-treatment methods	菌株 Strains	溶液中 K ⁺ 含量 Concentration of K ⁺ in solution	菌体钾含量 Content of K in cells	菌体吸附钾含量 Content of K absorbed by cells	总钾 Total K
无 None	<i>Mesorhizobium</i> sp. S-15	8.09 ± 0.59			
	<i>Paenibacillus</i> sp. S-17	8.87 ± 0.33			
	CK(不接菌 No strains)	6.54 ± 0.33			
H ₂ O ₂ 消毒 Digestion by H ₂ O ₂	<i>Mesorhizobium</i> sp. S-15	45.57 ± 4.09			
	<i>Paenibacillus</i> sp. S-17	51.01 ± 3.56			
	CK(不接菌 No strains)	22.66 ± 2.10			
细胞破碎 Cell disruption	<i>Mesorhizobium</i> sp. S-15	8.09 ± 0.59	0.00 ± 0.00		8.09 ± 0.59
	<i>Paenibacillus</i> sp. S-17	8.87 ± 0.33	0.00 ± 0.00		8.87 ± 0.33
	CK(不接菌 No strains)	6.54 ± 0.33	0.00 ± 0.00		6.54 ± 0.33
NH ₄ OAc 浸提 Extraction by NH ₄ OAc	<i>Mesorhizobium</i> sp. S-15	8.09 ± 0.59		2.13 ± 1.00	10.22 ± 1.59
	<i>Paenibacillus</i> sp. S-17	8.87 ± 0.33		0.54 ± 0.12	9.41 ± 0.45
	CK(不接菌 No strains)	6.54 ± 0.33		0.41 ± 0.00	6.95 ± 0.33

μg/mL

2.3 不同处理方法对 2 种解钾菌解钾效率测定结果的影响

根据所测溶液中 K^+ 质量浓度, 计算 2 株解钾菌的解钾效率, 并对其进行单因素方差分析 (SPSS Version 18.0), 结果如表 2 所示。对于 2 株解钾菌来说, 用 H_2O_2 处理后得到的解钾率均是最高, 分别为 101.1%、125.1%, 与其他处理方法间差异显著; 无前处理直接测钾和将细胞破碎后测钾所得的解钾率之间无差异; 中慢生根瘤菌 S-15 和类芽胞杆菌 S-17 的解钾率分别为 23.7%、35.7%, 说明细菌细胞内的 K^+ 可能是极少的, 用火焰光度计检测不到。而用 NH_4OAc 浸提后, 有少部分 K^+ 释放到溶液中, 2 株菌的解钾率分别为 47.1%、35.5%, 中慢生根瘤菌 S-15 较不经前处理时所测得的高, 而类芽胞杆菌 S-17 的解钾率则略有下降。

表 2 不同前处理方法检测解钾效率 (均值 \pm 标准差) 的比较

Table 2 Comparison of K solubilizing rate (Mean \pm SD) determined by four different pre-treatment methods %

前处理方法 Pre-treatment methods	2 种菌株的解钾率 Rate of potassium solubilizing by two strains	
	<i>Mesorhizobium</i> sp. S-15	<i>Paenibacillus</i> sp. S-17
	无前处理 None	23.7 \pm 9.0b
H_2O_2 消煮 Digestion by H_2O_2	101.1 \pm 18.1a	125.1 \pm 15.7a
细胞破碎 Cell disruption	23.7 \pm 9.0b	35.7 \pm 5.1b
NH_4OAc 浸提 Extraction by NH_4OAc	47.1 \pm 11.6b	35.5 \pm 5.8b

注: 表中字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。Note: The different letters means significant difference ($P < 0.05$)。)

3 讨论

解钾菌是自然界中天然存在的一种可以溶解硅酸盐矿物的细菌, 可以将矿物中难溶性的钾、硅等养分元素转化成可溶性养分。盛下放等^[8]对硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机制进行了研究, 认为硅酸盐细菌的荚膜多糖分子结构中含有具络合作用的官能团, 对钾长石的溶解起重要作用。如果解钾菌可以使矿物中溶解出的 K^+ 释放到周围的环境中, 就可直接被植物吸收利用, 但是解钾菌与矿物的相互作用均发生在细菌-矿物复合体中^[9], 因此, 从矿物中释放的 K^+ 极易吸附在矿物及细菌细胞表面, 可能只有很少一部分释放到周围环境中。

本研究通过不同前处理方法检测 2 株解钾菌的

解钾效率, 经过 6% H_2O_2 消煮后所测得的溶液中 K^+ 质量浓度最高, 得到的解钾率也最高, 与其他前处理方法得到的结果差异显著。 H_2O_2 可以氧化分解细菌表面荚膜, 并且在高温条件下, 细菌细胞会部分裂解, 所以, 经过 H_2O_2 处理后所检测到的钾离子包括溶液中游离态的钾、菌体吸附的钾和部分细胞内的钾, 这样计算得到的解钾效率是最贴近真实情况的, 是 4 种前处理方法所得到的结果中最准确的。

目前, 对真核细胞 (如人体红细胞) 中 K^+ 浓度的研究较多, 破碎细胞后常用火焰光度计^[10]或电解质监测仪^[11]测定细胞内的钾浓度。但是经过液体培养基摇瓶培养得到的细菌细胞质量小、数量少, 由于火焰光度计检测范围很小, 且检测下限的测量具有不确定性^[12], 很难直接检测出细菌细胞中的离子浓度。 Eisenstadt^[13]利用高特异活性⁴²K 的泄漏间接检测枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 生长、产芽胞过程中细胞中钾含量的变化, 在细菌生长对数期钾含量占细胞干质量的 2.5%~3.0%。此外, 细菌荚膜对硅酸盐矿物的络合主要是荚膜多糖中官能团的作用^[14], 与土壤胶体吸附阳离子的作用是不一样的, 用 NH_4OAc 浸提法测得的溶液中 K^+ 浓度并不准确。

本研究仅初步探讨了解钾菌解钾效率的检测方法, 下一步将结合解钾作用机制对其进行研究, 探索出一套标准的解钾效率检测方法, 为高效解钾菌的筛选提供理论基础和技术指导。

参 考 文 献

- [1] 易浪波, 彭清忠, 何齐庄, 等. 高效钾长石分解菌株的筛选、鉴定及解钾活性研究[J]. 中国微生物学杂志, 2012, 24(9): 773-776.
- [2] 闫华晓, 赵辉, 朱硕斐, 等. 硅酸盐细菌 DM S3 促进钾长石释钾及绿豆生长作用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(35): 17503-17504.
- [3] 连宾. 硅酸盐细菌 GY92 对伊利石的释钾作用[J]. 矿物学报, 1998, 18(2): 234-238.
- [4] 郑传进, 涂国全. 硅酸盐细菌解钾能力研究[J]. 韶关学院学报 (自然科学版), 2005, 26(6): 90-92.
- [5] 李玉梅, 王根林, 孙彬, 等. 不同磷钾水平对硅酸盐细菌解钾溶磷能力的影响[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 258-260.
- [6] 刘五星, 徐旭士, 杨启银, 等. 胶质芽胞杆菌对土壤矿物的分解作用及机理研究[J]. 土壤, 2004, 36(5): 547-550.
- [7] 鲍士旦. 土壤农化分析[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 2008: 106-107.
- [8] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌 NBT 菌株解钾机理初探[J]. 土壤学报, 2002, 39(6): 863-871.
- [9] 连宾, 傅平秋, 莫德明, 等. 硅酸盐细菌解钾作用机理的综合效

- 应[J].矿物学报,2002,22(2):179-183.
- [10] 马光斌,曲颖,徐铭益,等.天门冬氨酸钾对肝细胞内钾离子浓度及细胞膜 $\text{Na}^+ \cdot \text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响[J].肝脏,2012,17(4):243-246.
- [11] 刘兴敏,王迪芬,赵兰,等.围术期红细胞内外钾浓度变化临床研究[J].贵阳医学院学报,2000,25(4):344-346.
- [12] 唐际文.火焰光度计定量检测下限的测量不确定度的评定[J].计量技术,2004(3):53-56.
- [13] EISENSTADT E.Potassium content during growth and sporulation in *Bacillus subtilis* [J].J Bacteriol, 1972, 112(1): 264-267.
- [14] LIU W X, XU X S, WU X H, et al.Decomposition of silicate minerals by *Bacillus mucilaginosus* in liquid culture[J].Environ Geochem Health, 2006, 28(1/2):133-140.

Comparing different methods of detecting potassium solubilizing efficiency with potassium solubilizing bacteria

WANG Xunjue HUANG Qiaoyun CAI Peng CHEN Wenli

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Using *Mesorhizobium* sp.S-15 and *Paenibacillus* sp.S-17 as experimental strains. After cell disruption, NH_4OAc extraction, H_2O_2 solution digestion or without any pre-treatment, K^+ content in the fermentation broth of potassium solubilizing bacteria was determined with flame photometer. The efficiency of K solubilizing by potassium solubilizing bacteria in the culture medium was calculated. The results showed that the standard curves of the three kinds of K series of standard solutions were similar with the R^2 values of 0.994 4, 0.999 7 and 0.999 8, respectively. After digested by H_2O_2 solution, concentration of K^+ was detected. The efficiency of two strains was 101.1% and 125.1%, significantly higher than that of other groups. The efficiency of potassium solubilizing detected after H_2O_2 digestion well reflected potassium solubilization of bacteria.

Keywords potassium solubilizing bacteria; efficiency of potassium solubilizing; K^+ ; bio-potassium fertilizer; pre-treatment methods; detection method

(责任编辑:张志钰)