

硅酸盐细菌 NBT 菌株生理特性的研究

盛下放 黄为

(南京农业大学资环学院微生物学系, 南京 210095)

摘要 对硅酸盐细菌 NBT 菌株在以钾长石粉为唯一钾源的培养基中产生的有机酸、氨基酸的种类和含量以及 NBT 菌株在有氮培养基中产生的植物激素的种类和含量进行了研究。结果表明, NBT 菌株能合成草酸、酒石酸、柠檬酸和苹果酸等四种有机酸, 其含量范围分别为 $5.16 \sim 217.30 \text{ mg L}^{-1}$, $3.44 \sim 291.94 \text{ mg L}^{-1}$, $4.08 \sim 113.31 \text{ mg L}^{-1}$ 和 $3.15 \sim 108.89 \text{ mg L}^{-1}$; 同时, NBT 菌株能合成多种氨基酸。NBT 菌株在有氮培养基中能产生并分泌生长素、赤霉素 A_3 (GA_3)、玉米素核苷和异戊烯基腺嘌呤四种激素; 其浓度分别为 $0.54 \sim 3.77 \text{ nmol ml}^{-1}$ 、 $0.19 \sim 2.97 \text{ nmol ml}^{-1}$ 、 $0.91 \sim 2.62 \text{ nmol ml}^{-1}$ 和 $5.49 \sim 31.15 \text{ nmol ml}^{-1}$ 。摇瓶试验表明, NBT 菌株不仅能分解土壤矿物并释放出其中的钾, 而且具有很强的吸钾功能。NBT 菌株细胞吸持的钾占其解钾量的 $88.86\% \sim 95.05\%$ 。

关键词 硅酸盐细菌, 有机酸, 氨基酸, 植物激素, 钾的吸持

中图分类号 S154.34

硅酸盐细菌是土壤中一类能分解硅酸盐类矿物并释放出磷、钾等元素供植物利用的细菌, 同时, 硅酸盐细菌亦有固氮功能^[1]。硅酸盐菌剂作为一种微生物肥料, 在实际应用中表现出了改善土壤肥力、提高作物产量等方面的作用^[2,3]。但亦有研究^[4]指出其应用效果的不稳定性。由于硅酸盐细菌的应用性研究较多, 基础理论性研究滞后, 从而制约了微生物肥料的发展。陈廷伟^[5]、李元芳^[1]等对硅酸盐细菌的形态、生理作了一些初步研究。但对硅酸盐细菌改善作物钾素营养, 促进作物生长的机制以及对钾离子的吸持作用等方面的系统性研究工作至今未见报道。为此, 作者进行了这方面研究, 以期对硅酸盐细菌的解钾机理及科学应用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

菌种: 硅酸盐细菌 NBT 菌株(本室分离筛选)。钾长石粉: 钾长石(南京地质矿产研究所惠赠)研磨, 过 100 目筛, 水洗去水溶性钾, 阴干。土壤矿物(钾铝酸盐): 取黄棕壤(5~10cm 深度)加 20% HCl(土: 20% HCl=1:10)煮沸 30min 后蒸馏水洗至无 Cl^- 。培养基($g L^{-1}$): A: 蔗糖 10.0, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, Na_2HPO_4 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.1, 酵母膏 0.5, $CaCO_3$ 1.0, 钾长石粉 10.0, pH 7.2; B: 蔗糖 10.0, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0, K_2HPO_4 2.0, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5, NaCl 0.1, 酵母膏 0.5, $CaCO_3$ 1.0, pH 7.2; C: 蔗糖 0.75, $(NH_4)_2SO_4$ 0.15,

Na_2HPO_4 0.30, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075, 钾铝酸盐 10.0。

1.2 有机酸、氨基酸的分析

500ml 三角瓶中装 100ml 培养基 A, 121℃ 高压灭菌 20min, 冷却后将硅酸盐细菌菌悬液按 5% 接种量接入三角瓶中, 28℃ 振荡 (180r/min) 培养; 培养时间 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96h 后分析。

有机酸的测定: 发酵液中有有机酸系用硫酸提取法^[6], 用 HPLC 法测各种有机酸含量。根据保留时间和加入标准样品观察峰高变化法定性, 根据峰面积定量。色谱条件: 色谱柱 ALLTMA C_{18} (150mm × 4.6mm), 流动相 0.1% H_3PO_4 , 流速 0.7ml/min, 柱温 40℃, $\text{UV}_{\lambda=214\text{nm}}$ 检测。

氨基酸的测定: 发酵液的处理用三氯醋酸法, 用 0.02mol L⁻¹ HCl 稀释至适当的浓度后用氨基酸分析仪 (835-50 氨基酸分析仪) 测定。分析条件: 氨基酸分析专用阳离子交换柱 (0.4cm × 30cm), 柱温 62℃, 流速 0.4ml/min, 检测器 $\text{UV}_{\lambda=254\text{nm}}$ 。

1.3 植物激素分析

250ml 三角瓶中装培养基 B 50ml, 121℃ 灭菌 20min, 按硅酸盐细菌培养液 (4.97×10^8 个/ml) 2.5ml, 置旋转式摇床上 (180r/min), 30℃ 培养。培养时间 1, 2, 3, 4d, 分别取样分析测定。

植物激素提取参考 Tien 等的方法^[7]。酶联免疫法 (ELISA) 检测生长素、赤霉素和细胞分裂素含量。

1.4 NBT 菌株对土壤矿物的分解及吸钾作用分析

在 250ml 三角瓶中装 100ml 培养基 A 或 C, 121℃ 灭菌 30min, 按 5% 菌悬液量接种, 对照处理为加等量灭活菌液 (CK1) 和不接菌 (CK2), 试验设三个重复, 30℃ 旋转式摇床 (180r/min) 培养。培养时间为 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96, 120h 后分析。

1.5 样品处理

取培养一定时间的样品, 一部分离心 (12,000r/min, 15min), 取上清; 另一部分按文献[5]方式处理, 上清液和滤液用原子吸收分光光度法测钾。

2 结果与讨论

2.1 NBT 菌株发酵液中有有机酸、氨基酸的种类和含量

细菌发酵液中低分子量有机酸的提取、分离和测定, 迄今为止尚缺乏一种成熟的方法和技术, 由于细菌发酵液中有较多的干扰成分, 特别是发酵液中的氨基酸对小分子有机酸测定的干扰, 在用 HPLC 法测定低分子量有机酸时, 不能获得较理想的测定结果。因此, 样品的前处理就是一项很重要的工作。在样品的前处理中, 关键是除去样品中的小分子氨基酸成分。在测定发酵液中低分子量不挥发性有机酸时, 采用了二步处理法。第一步, 用硫酸将发酵液中的有机酸浸提出来; 第二步, 通过阳离子交换树脂将浸提液中的小分子氨基酸交换除去, 然后用 HPLC 法测定滤液中的有机酸。根据保留时间和加入标准样品观察峰高变化法定性, 根据峰面积定量。NBT 菌株不同时期发酵液中均检测到草酸、酒石酸、柠檬酸和苹果酸等四种有机酸 (见表 1)。其含量范围分别为 5.16~217.30mg L⁻¹, 3.44~291.94mg L⁻¹, 4.08~113.31mg L⁻¹ 和 3.15~108.89mg L⁻¹; 由表 1 可以看出, 随着培养时间延长, 发酵液中有有机酸含量逐渐增加; 培养时间 60~72h, 四种有机酸含量达最大, 此时发酵液中的细胞数量也为最多 ($2.2 \sim 6.4 \times 10^7$ 个 ml⁻¹); 72h 后发酵液中有有机酸含量大大减少。由此可以看出, 细胞合成的有机酸含量与细胞的代谢活性密切相关。本试验同时进行了四种有机酸回收率测定, 结果表明, 草酸、酒石酸、柠檬酸和苹果酸的回收率分别为 65.16%, 97.07%, 94.63% 和 88.89%, 说明除草酸的回收率较低外, 对于其他的

三种有机酸用硫酸法提取可以得到比较满意的结果。

表 1 NBT 菌株不同时期发酵液中四种有机酸的含量

Table 1 Contents of organic acids in strain NBT fermented broth

培养时间 Time(h)	草酸 Oxalic	酒石酸 Tartaric	柠檬酸 Citric	苹果酸 Malic	细胞数 Number of cells (x ml ⁻¹)
0	5.16	3.44	4.08	3.15	7.4 × 10 ⁴
12	78.66	71.31	59.06	60.85	5.3 × 10 ⁵
24	82.85	83.65	77.87	66.51	1.0 × 10 ⁶
36	105.68	149.97	83.78	69.11	4.2 × 10 ⁶
48	106.62	291.94	107.14	108.89	9.6 × 10 ⁶
60	217.30	117.38	113.31	78.36	2.2 × 10 ⁷
72	78.66	99.78	83.23	61.81	6.4 × 10 ⁷
96	66.38	77.96	80.51	33.36	2.7 × 10 ⁷

菌株 NBT 可以合成 16 种氨基酸(表 2), 其中二种酸性氨基酸, 二种碱性氨基酸以及带有羟基的氨基酸(丝氨酸, 酪氨酸)和中性氨基酸。谷氨酸含量最高, 达 0.156~3.497mg L⁻¹, 其次是胱氨酸(0.207~1.160mg L⁻¹); 天门冬氨酸、胱氨酸、蛋氨酸、酪氨酸等几种氨基酸主要在发酵前期合成, 随着发酵时间延长, 发酵液中这几种氨基酸浓度逐渐下降。说明细胞部分利用了这几种氨基酸。谷氨酸、甘氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸和精氨酸等几种氨基酸, 随着培养时间的延长, 发酵液中上述几种氨基酸浓度逐渐增加, 说明 NBT 菌株细胞能不断地合成这几种氨基酸。

表 2 菌株 NBT 合成的氨基酸种类和含量

Table 2 Variety and contents of amino acids produced by strain NBT

氨基酸 Amino acids	不同时间的氨基酸含量			
	Content of amino acids at different times			
	24h	36h	48h	72h
	mg L ⁻¹			
天门冬氨酸	0.087	0.040	—	—
苏氨酸	0.079	0.108	0.361	0.305
丝氨酸	0.070	0.108	0.191	0.223
谷氨酸	0.156	0.430	2.907	3.497
甘氨酸	0.411	0.265	0.396	0.412
丙氨酸	0.237	0.135	0.575	0.601
胱氨酸	1.160	0.207	—	—
缬氨酸	0.104	0.261	0.569	0.657
蛋氨酸	0.589	0.178	0.084	0.018
异亮氨酸	0.910	0.126	0.063	0.083
亮氨酸	0.089	0.112	0.190	0.215
酪氨酸	0.396	0.164	0.071	—
苯丙氨酸	—	0.089	0.145	0.163
赖氨酸	0.131	0.144	0.401	0.537
精氨酸	—	0.158	0.297	0.389

注: —未检测到 —No determination

2.2 NBT 菌株产生的植物激素

硅酸盐细菌 NBT 菌株在有氮培养基中能产生并分泌生长素 (IAA)、赤霉素 A₃ (GA₃)、玉米素核苷 (ZR) 和异戊烯基腺嘌呤 (IPA) 四种激素; 其浓度分别为 0.54~ 3.77nmol ml⁻¹、0.19~ 2.97nmol ml⁻¹、0.91~ 2.62nmol ml⁻¹和 5.49~ 31.15nmol ml⁻¹。由图 1 可以看出: 在培养的初期, 发酵液中的含量较少, 培养三天, 虽然细胞数量最多, 但发酵液中 IAA, GA₃ 的量没有达最大, 随着培养时间延长, 细胞部分衰亡, 自溶, 产生的 IAA, GA₃ 分泌到培养液中, 使培养液中的 IAA, GA₃ 浓度增加, 说明 IAA, GA₃ 是在稳定期的后期大量产生; 培养三天的发酵液中 ZR, IPA 含量最多, 此时细胞数量也最大, 达 3.83×10⁸ 个 ml⁻¹, 随着培养时间延长 ZR, IPA 的量很快下降, 说明 ZR, IPA 是在菌体细胞的对数生长期至稳定期产生。本试验所列激素含量为实测值, 在提取和纯化过程中的损失未计算在内。

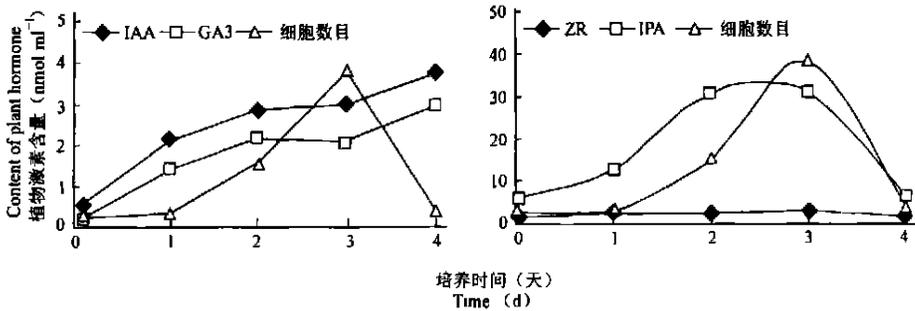


图 1 硅酸盐细菌 NBT 菌株产生的植物激素的浓度变化

Fig. 1 Change in concentration of plant hormone produced by strain NBT

2.3 NBT 菌株对硅酸盐矿物中钾的活化及吸持

硅酸盐细菌 NBT 菌株在摇瓶条件下表现出较强的分解硅酸盐矿物的能力 (见表 3)。

表 3 NBT 菌株对硅酸盐矿物中钾的活化及吸持

Table 3 Activation and absorption of potassium from silicate mineral by strain NBT

培养时间 Time (h)	钾长石 Feldspar			土壤矿物 Soil mineral				细胞数 ml ⁻¹ Number of cells		
	SQJ		XBJ	SQJ		XBJ		钾长石 Feldspar	土壤矿物 Soil mineral	
	对照			对照		样品				
	CK1	CK2	Sample	CK1	CK2	Sample				
	mg L ⁻¹									
0	36.4	—	36.4	—	38.2	—	38.2	—	5.3 × 10 ⁴	5.3 × 10 ⁴
12	38.8	—	45.1	24.3	40.1	—	47.4	28.8	1.0 × 10 ⁴	4.8 × 10 ⁵
24	38.4	—	15.9	104.9	43.6	—	25.6	46.2	4.2 × 10 ⁵	5.5 × 10 ⁵
36	39.1	—	13.2	137.8	44.7	—	18.3	58.7	8.7 × 10 ⁶	9.2 × 10 ⁶
48	41.4	—	9.2	152.4	47.8	—	11.5	71.7	9.6 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁷
72	42.8	—	9.8	188.2	48.9	—	10.2	81.4	6.4 × 10 ⁷	7.6 × 10 ⁷
96	45.7	—	13.6	161.8	49.4	—	11.6	76.6	2.7 × 10 ⁷	3.5 × 10 ⁶
120	48.8	5.7	48.3	159.6	51.6	9.8	47.4	58.3	2.2 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁵

注: SQJ, 上清液中的钾, K in Supernatant; XBJ, 细胞吸持的钾, K adsorpted by cells

且这种分解能力随着时间的延长而增强。培养时间 120h, NBT 菌株可以从钾长石中释放出 207.9 mg L^{-1} 钾, 比接灭活菌对照 (48.8 mg L^{-1}) 增加 326.02%, 经生物学统计分析, 差异达极显著水平 ($F = 3991.9 > F_{0.01} = 10.92$); 以土壤矿物(钾铝酸盐)为底物, NBT 菌株能释放出 105.7 mg L^{-1} 钾, 比接灭活菌对照 (51.6 mg L^{-1}) 增加 104.84%, 差异达极显著水平 ($F = 3110.2 > F_{0.01} = 10.92$)。另外, NBT 菌株不仅表现出较强的解钾功能, 同时表现出一定的持钾作用。以钾长石为底物, 培养 72 小时, 接灭活菌对照上清液中钾含量为 41.8 mg L^{-1} , 而接菌处理的上清液中钾仅为 9.8 mg L^{-1} , 细胞吸持的钾 (188.2 mg L^{-1}) 占总解钾量的 95.05%; 以土壤矿物为底物, 接灭活菌对照上清液中钾含量为 48.9 mg L^{-1} , 而接菌处理的上清液中钾仅为 10.2 mg L^{-1} , 细胞吸持的钾 (81.4 mg L^{-1}) 占总解钾量的 88.86%。培养时间在 48~72h 之间, 细胞数量最多, 细胞吸收的钾也最大 (88.86%~95.05%)。

3 结 论

在摇瓶条件下, 硅酸盐细菌 NBT 菌株能活化硅酸盐矿物中的钾。在以钾长石为唯一钾源的培养基中, NBT 菌株能合成草酸、酒石酸和苹果酸等有机酸和多种氨基酸, 且 NBT 菌株的解钾作用与 NBT 菌株合成的有机酸、氨基酸的种类和含量密切相关。在有氮培养基中, NBT 菌株能合成生长素、赤霉素和细胞分裂素等植物激素。因此, 可以认为硅酸盐细菌促进作物生长的机理在于硅酸盐细菌既能通过解钾作用为作物提供钾素营养, 又能通过合成的植物激素来促进作物生长。另外, 硅酸盐细菌还具有较强的吸钾功能, 硅酸盐细菌通过将环境中多余的钾离子吸收到细胞中来减少钾的流失, 可以提高钾肥利用率。硅酸盐细菌能释放由硅酸盐组成的岩石矿物中的磷、钾、硅等元素, 直接供给植物生长利用^[8]。这为挖掘土壤潜在肥力、发展可持续农业提供了诱人的前景。为了充分发挥硅酸盐菌剂高效、稳定的促进作物生长, 降低生产成本, 改善环境条件的功能, 有必要对硅酸盐细菌在土壤中的动态变化及其生理功能等作进一步研究。

参 考 文 献

1. 李元芳. 硅酸盐细菌肥料的特性和应用. 土壤肥料, 1994, (2): 48~49
2. 张国斌. 生物钾肥及使用技术. 农业科技通讯, 1999, (1): 39~40
3. 施振云, 王德君, 倪礼斌. 硅酸盐菌剂对水稻的增产效果. 土壤肥料, 1999, (2): 39~40
4. 黄昭贤, 蒋将军, 彭盛德. 硅酸盐细菌的研究现状及展望. 世界农业, 1998, (5): 28~31
5. 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
6. 周惠民. 苏打盐渍土中有机酸的提取方法. 土壤学报, 1965, 13(3): 325~328
7. Tien T M, Gaskins M H, Hubbell D H. Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet. *Appl. Envir. Microbiol.*, 1979, 37(1): 1016~1020
8. 贺积强, 李登煜, 张小平等. 硅酸盐细菌的研究进展. 西南农业学报, 1999, 12: 102~108

PHYSIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF STRAIN NBT OF SILICATE BACTERIUM

Sheng Xia-fang Huang Wei-yi

(Microbiology Department of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Summary

The variety and contents of organic and amino acids produced by strain NBT under culture of feldspar were determined. The results showed that strain NBT was able to produce Oxalic, tartaric, citric and malic acids, whose concentrations ranged between $5.16 \sim 217.30 \text{ mg L}^{-1}$, $3.44 \sim 291.94 \text{ mg L}^{-1}$, $4.08 \sim 113.31 \text{ mg L}^{-1}$ and $3.15 \sim 108.89 \text{ mg L}^{-1}$ respectively. Several kinds of amino acids were also produced. In media with nitrogen, the strain NBT could produce IAA, GA₃, ZR and IPA. Their concentrations ranged between $0.54 \sim 3.77 \text{ nmol ml}^{-1}$, $0.19 \sim 2.97 \text{ nmol ml}^{-1}$, $0.91 \sim 2.62 \text{ nmol ml}^{-1}$ and $5.49 \sim 31.15 \text{ nmol ml}^{-1}$ respectively. The flask shake experiment showed that the strain NBT was capable of not only releasing potassium from soil minerals but also absorbing most of the potassium released. The K adsorbed by the cells accounted for 88.86% ~ 95.05% of the K released by the strain NBT.

Key words Silicate bacteria, Organic acids, Amino acids, Plant hormone, K uptake