2022, 35(1): 172-181
http://www.lykxyj.com

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2022.01.020

一株南方红壤区杉木根际高效解钾菌的筛选、鉴定及其培养条件优化

赵　君[1,3]，饶惠玲[1,3]，冯清玉[1,3]，黄　伟[1,3]，吴承祯[2,3]，李　键[1,3*]

(1. 福建农林大学林学院, 福建 福州　350002；2. 武夷学院生态与资源工程学院, 福建 南平　354300；
3. 福建省高校森林生态系统过程与经营重点实验室 福建 福州 350002)

摘要:［**目的**］南方红壤区杉木人工林下根际土壤存在低钾胁迫环境，通过筛选、鉴定、优化培养高效解钾菌株，能够丰富解钾微生物资源库，为林木解钾工程菌的开发提供研究基础与数据支持。［**方法**］从不同林龄（2，4，10，15 a）杉木人工林下根际土壤中分离筛选出 79 株解钾菌，并根据其形态、生长特征选取 20 株优势菌株，通过测定发酵液可溶性钾含量及解钾率筛选出 1 株最优解钾菌株，经 16S rDNA 鉴定确定菌属，采用单因素实验与正交试验对该菌株的培养基组分与培养条件进行优化。［**结果**］（1）初筛获得的 20 株测试菌株中，共 13 株菌株解钾率为正值，即有效分解钾长石的解钾菌占 65%。（2）经鉴定，芽孢杆菌属（*Bacillus altitudinis*）的 JK13 为最优解钾菌，其发酵液可溶性钾含量为 81.06 μg·mL^{-1}，解钾率为 60.49%，显著高于其他菌株（$P < 0.05$）。（3）经单因素实验与正交试验，确定菌株 JK13 在以 0.5% 甘露醇为碳源、以 1.5% 酵母粉为氮源、初始 pH 值为 9、装液量为 30 mL·100 mL^{-1}、接种量为 1%、培养温度为 35℃ 时菌液 OD_{600} 值显著高于 CK（$P < 0.05$）。［**结论**］属于芽孢杆菌属的 JK13 具有高效解钾能力，优化后以 0.5% 甘露醇、1.5% 酵母粉为最适培养基组分，培养条件在弱碱、高温下能够显著提高菌株生长量，研究结果能够为改善林木钾素利用提供菌种资源与生物工程支持。

关键词: 杉木；解钾菌；筛选与鉴定；培养条件优化

中图分类号: S154.5　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1001-1498(2022)01-0172-10

氮、磷、钾三大营养元素在植物的生长发育过程中起着不可或缺的作用，而钾元素在提高关键光合酶活性、提高叶绿素含量、维持细胞电荷平衡[1]等方面的作用尤为突出。我国南方红壤区 92%～98% 的钾元素以矿物质的形式存在[2]，不易被植物吸收利用，进而影响植物的生长、产量、品质等。目前，优化提升土壤钾素含量多以施用钾肥为主，但我国钾肥储量并不富余，需以进口手段满足需求[3]，且随着钾肥频繁使用，土壤污染加重。因此，如何高效转化土壤中的缓效钾元素，从而低成本高效的促进植物的吸收利用和生长发育，是近来土壤和植物营养学界关注的热点之一。

土壤微生物组通过自身代谢参与植物养分元素循环[4]、通过竞争或合作关系等促进根际微环境稳定[5]，对植物的生长和健康有明显增益作用。解钾菌作为土壤微生物的重要组成部分，对含钾硅酸盐矿物具有分解作用，是将土壤中的缓效钾转化为速效钾的有效绿色微生物肥料[6]。在探索利用解钾菌改善农作物低钾胁迫方面，前人已有诸多尝试[7-9]，但微生物肥料种类繁多并具专一性，不同作物根际筛选出的解钾菌能力各不相同，只有以土壤环境、植物种类等为选择依据，施用最适解钾菌才能产生

收稿日期：2021-03-12　　修回日期：2021-05-20
基金项目：国家自然科学基金（32071753）；福建农林大学林学高峰学科建设项目（71201800705）
* 通讯作者: 李键. E-mail: jianli@fafu.edu.cn

最大效益[10]。

我国南方红壤区主要造林树种杉木（*Cunninghamia lanceolata* (Lamb.) Hook.）具有经济、速生、丰产的特点，在提供生产用材、建筑用材、水土保持等方面具有较高的经济、生态价值。杉木多采用实生苗进行造林[11]，在育苗和造林初期往往存在立地困难，诸如幼苗需水量大、固碳能力不完善等[12]，而钾素在调节其细胞吸水[13]、加速植物木质化速率[14]、促进根系生长发育[15]等方面发挥着不可或缺的作用，能够显著提升杉木幼苗抗性和存活率。近年来，微生物组技术在解决农田养分匮乏、提高植物抗性、缓解农业废弃物污染等方面已有了大量探索和初步成效[16]，这为利用林木生物工程菌种解决钾素匮乏问题提供了全新的思路，因此，本研究以南方红壤区杉木人工林下根际土壤为研究对象，分离筛选高效解钾菌并分析其解钾能力，经 16S rDNA 鉴定确定其属，通过单因素实验与正交试验来优化高效解钾菌的生长条件，以期获得高效解钾菌的最佳培养量，为解钾工程菌的开发奠定研究基础，亦为改善南方红壤区杉木人工林下根际土壤营养元素环境提供新的路径。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本实验土壤样品采集于福建省南平市建阳区小湖镇溪东国有林场，26°40′～27°20′ N，118°08′～120°31′ E，位于武夷山脉南侧。为中亚热带季风气候，季风气候显著，春暖秋凉，夏季高温多雨，冬季温和少雨。实验地土壤为花岗岩发育的暗红壤，土层厚度在 90 cm 以上，海拔高度 350 m 左右，坡度范围 20°～35°。相关研究表明，杉木人工林幼龄到中龄的全钾含量增加[17]，即幼龄阶段杉木低钾胁迫更为严峻，因此本研究选取南方红壤区不同林龄（2，4，10，15 a）杉木人工林下根际土壤作为实验样品，以便更为全面的筛选高效解钾菌株。

1.1.1　土壤样品采集及理化性质测定　采用五点取样法选取取样点，采用分层取样法[18]以及抖落法[19]采集根际土壤，采用四分法去除多余土样，新鲜根际土样置于冰箱（4℃）保存以备菌株的筛选，非根际土样待风干后测定土壤理化性质。其中，分别采用钼锑抗比色法、盐酸-硫酸浸提法测定全磷、有效磷，采用重铬酸钾-外加热法测定有机质，分别采用半微量凯氏法、碱解-扩散法测定全氮、水解氮，分别采用碱熔-火焰光度法、乙酸铵浸提-火焰光度法测定全钾、速效钾，采用电位法测定 pH[20]。

1.1.2　培养基　解钾菌的初筛采用亚历山大硅酸盐初筛培养基[21]：蔗糖 5.0 g，硫酸镁 0. 5 g，磷酸氢二钠 2.0 g，碳酸钙 0.1 g，三氯化铁 0.005 g，钾长石粉 1.0 g，琼脂 18.0 g，去离子水 1 000 mL，pH 7.0～7.5。

培养初筛得到的解钾菌采用种子液培养基[22]：蔗糖 10.0 g，硫酸镁 0.5 g，碳酸钙 1.0 g，硫酸铵 1.0 g，氯化钠 0.1 g，酵母膏 0.5 g，磷酸氢二钾 2.0 g，pH 7.2～7.4，去离子水 1 000 mL。

解钾菌的复筛采用摇瓶复筛培养基[23]：蔗糖 10.0 g，硫酸镁 0.5 g，碳酸钙 1.0 g，硫酸铵 1.0 g，氯化钠 0.1 g，酵母膏 0.5 g，磷酸氢二钠 2.0 g，钾长石粉 10.0 g，pH 7.2～7.4，去离子水 1 000 mL。

发酵基础培养基采用 LB 培养基[24]：胰蛋白胨 10.0 g，酵母浸出粉 5.0 g，葡萄糖 0.5 g，氯化钠 0.5 g，pH 7.0～7.2。

1.2　解钾菌的筛选、鉴定及培养条件优化

1.2.1　解钾菌分离与纯化　菌株分离：配置一定浓度（10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}）的土壤悬液，将其涂于亚历山大硅酸盐培养基平板中央，将涂布后的平板倒置并转移至恒温培养箱（30℃，4 d）培养。每个梯度设 3 个重复并编号，培养过程中观察菌落形态，以菌落形态呈圆形、透明、凸起较高、表面湿润粘稠且富有弹性为筛选指标挑取菌落。

菌株纯化：采用划线法纯化分离筛选后的解钾菌并于 30℃ 培养箱培养 3～7 d，反复纯化 2～3 次，于电子显微镜下观察菌落形态。将纯化后的解钾菌转移至 LB 培养基，保存于冰箱（4℃）备用[25]。

1.2.2　解钾菌筛选　将上述挑选好的解钾菌进行摇瓶液体培养释钾实验以测定其解钾能力。各取 10 mL 解钾菌培养液经离心处理（4℃，6 000 r·min^{-1}，10 min）后取上清液，加入 5 mL 浓硫酸与 2 mL 30% 过氧化氢溶液消煮，并反复加 30% 过氧化氢溶液数次至粘性物质完全消化后，定容至 50 mL 后用火焰原子吸收分光光度法测定菌株培养液中可溶性钾的含量[26]。

$$R = \frac{K - CK}{CK}$$

R 为解钾率（%），*K* 为接种发酵液中的钾含量（μg·mL^{-1}），*CK* 为未接种解钾菌培养液的钾含量（μg·mL^{-1}）。

1.2.3 菌株 16S rDNA 鉴定 利用天根细菌基因组提取试剂盒（DP302−02）提取菌株的总 DNA 并进行 PCR 扩增，将产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳，割取目的条带，按照天根回收试剂盒（DP214−03）纯化回收，送往上海迈浦生物科技有限公司进行测序。将测序结果提交至 RDP 及 NCBI 数据库中进行序列比对分析，选取与 Genbank 中同源性最高的序列，确定菌株类型。

1.2.4 培养条件优化 培养基组分优化：将基础培养基中的碳源分别用葡萄糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉、麦芽糖、甘露醇代替，依据菌液 OD_{600} 确定最佳碳源。选用最佳碳源设置浓度梯度（0.5%、1.0%、1.5%）并根据菌液 OD_{600} 值确定最适浓度。利用硫酸铵、氯化铵、硝酸钾、蛋白胨、酵母粉、尿素替换基础培养基中的氮源以确定最佳氮源，改变最佳氮源浓度（0.5%、0.8%、1.0%、1.3%、1.5%）确定其最适浓度。

培养条件优化：基础培养基组分保持不变，分别对菌株发酵液培养条件进行梯度设置（pH 为 5.0、6.0、6.5、7.0、7.2、7.5、8.0、9.0；装液量为 10、20、30 、40、60 mL；接种量为 1%、3%、5%、7%、9%；培养温度为 20℃、25℃、28℃、30℃、35℃、40℃），记录各组处理菌液 OD_{600} 值，确定最适培养条件。

正交试验：根据单因素实验结果，设计 L9（3^4）四因素（A：初始 pH；B：装液量；C：接种量；D：培养温度）三水平正交试验，每组处理设置 3 个重复。

1.3 数据处理与方法

采用 Excel 2010 进行原始数据的整理与分析，运用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析（One-Way ANOVA）比较不同菌株解钾量的差异进行方差分析，正交试验数据处理采用正交设计助手Ⅱ V3.1。采用 Pearson 相关系数法确定 pH 与溶磷量之间相关关系，采用最小显著差异法（LSD 法）进行显著性检验和多重比较，显著性水平 0.05。

2 结果与分析

根据 1.1.1，得出研究区土壤基本理化性质（表 1）。

表 1 杉木人工林土壤基本理化性质

Table 1 Basic physiochemical properties of Chinese fir plantation soil

林龄 Age /a	TP/（g·kg^{-1}）	AP/（mg·kg^{-1}）	PAP/%	OM/（g·kg^{-1}）	TN/（g·kg^{-1}）	HN/（mg·kg^{-1}）	TK/（g·kg^{-1}）	AK/（mg·kg^{-1}）	pH
2	0.34	20.56	6.14	32.03	0.99	73.46	2.74	20.39	5.26
4	0.37	12.58	3.45	23.27	0.75	63.99	1.83	22.15	5.35
10	0.53	11.10	2.10	34.27	1.10	140.11	1.54	12.16	5.34
15	0.30	13.08	4.30	33.15	1.07	193.87	3.62	23.88	5.29

注：TP：全磷；AP：有效磷；PAP：有效磷所占比例；OM：有机质；TN：全氮；HN：水解氮；TK：全钾；AK：速效钾。

TP: Total phosphorus; AP: Available phosphorus; PAP: Proportion of available phosphorus; OM: Organic matter; TN: Total nitrogen; HN: Hydrolyzed nitrogen; TK: Total kalium; AK: Available kalium.

2.1 解钾菌的分离与形态学特征

从不同林龄杉木人工林下根际土壤中共分离出 79 株解钾菌，根据分离纯化过程中菌株的形状、颜色、大小、生长速度快慢等特征[11]，挑选出 20 株优势菌株（编号 JK1−JK20）用于摇瓶液体培养，测定其解可溶性钾含量并计算解钾率以筛选高效解钾菌。本次实验筛选出的解钾菌都为细菌，绝大多数菌株的菌落形态呈现圆形、透明、凸起、边缘整齐、表面湿润粘稠且富有弹性，亦存在颜色为淡红色、乳白色半透明的情况；菌体形态多为长杆状，两端钝圆，常成对状、链状排列；绝大多数菌株具备芽孢，芽孢呈椭圆或卵圆状，并有肥厚荚膜存在。

2.2 解钾菌的解钾能力测定与筛选

测定不同菌株发酵液的可溶性钾含量（图 1），不同菌株解钾量存在差异。各菌株发酵液的可溶性钾含量范围为 38.29～81.06 μg·mL^{-1}。整体来看，20 株菌株中共有 13 株解钾量显著高于 CK，占比 65%，可溶性钾含量较 CK 增加量的范围为 1.66～30.55 μg·mL^{-1}，分解钾长石矿能力明显。

JK13 解钾量为 81.06 μg·mL^{-1}，为 CK 的 1.6 倍，显著高于其他菌株（$P < 0.05$），其次为 JK2、JK16。以上 13 株菌株中，解钾率高于 20% 的菌株共计 7 株，占比 53.85%，解钾率低于 10% 的菌株共计 3 株，占比 23.08%（图 2）。

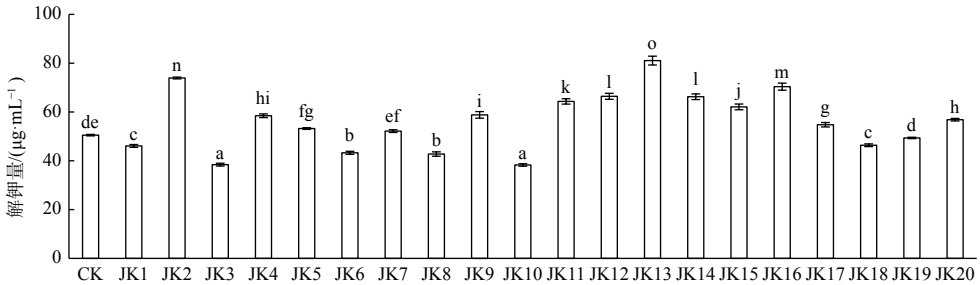


图 1　不同解钾菌解钾量

Fig. 1　The amount of potassium in different solutions

不同菌株解钾率（图 2）存在显著差异（$P < 0.05$），大部分菌株解钾率为正。综合解钾率与解钾量二者来看，JK13 解钾率最高，为 60.49%，其次 JK2 和 JK16 的解钾率为 46.37%、39.33%。此外，菌株 JK1、JK3、JK6、JK8、JK10、JK18、JK19 这 7 株菌的培养液可溶性钾含量低于 CK，说明这 7 株菌株不具备解钾能力，原因可能是这些菌株本身在成长繁殖过程中需要吸收一定量的钾素[27]。另外，前期处理过程中的 H_2O_2 灰化处理并不能使菌株体内的钾完全释放，也可能在转移过程中有部分速效钾被破坏导致流失。

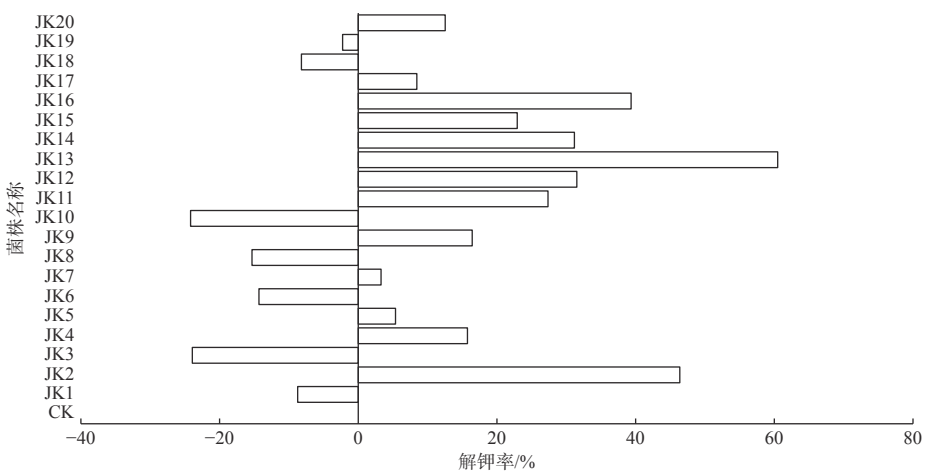


图 2　不同解钾菌解钾率

Fig. 2　The potassium solvability of different potassium-solubilizing bacteria

对上述 20 株菌株发酵液进行 pH 测定，发现各菌株 pH 值显著低于 CK（$P < 0.05$），解钾菌在代谢过程中会产生酸性物质，进而提高对钾长石矿中不可溶钾向可溶性钾转化的效率，提高溶液钾离子含量[28]。其中，JK15 的 pH 值最低，为 4.12，其解钾率为 22.93%，具有较好的解钾能力，其次 JK20 的 pH 值为 4.20，但其解钾率为 12.54%。对 13 株有效解钾菌的解钾量与发酵液 pH 值进行相关性分析（图 3），得出二者之间不存在相关关系（R^2=0.852，$P > 0.05$）。由此可见，虽然解钾菌

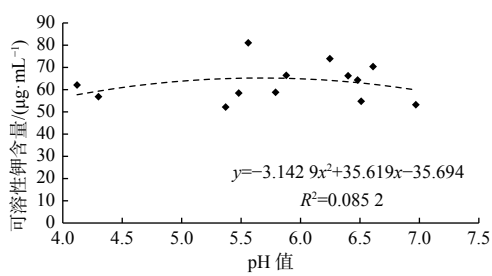


图 3　溶解量与培养液 pH 的关系

Fig. 3　Relationship between pH and potassium-solubilizing ability

株在解钾过程中都能分泌酸性物质，但是菌株解钾能力的强弱与发酵液 pH 值大小并无直接相关关系。

2.3 菌株鉴定结果

经鉴定，菌株 JK13 属芽孢杆菌属（*Bacillus altitudinis*），且进行比对的序列片段与高地芽孢杆菌（*Bacillus altitudinis*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）相似性达到 100%，与嗜气芽孢杆菌（*Bacillus aerophilus*）、同温层芽孢杆菌（*Bacillus stratosphericus*）、地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）及空气芽孢杆菌（*Bacillus aerius*）4 个种的相似性达到 99%（图 4）。

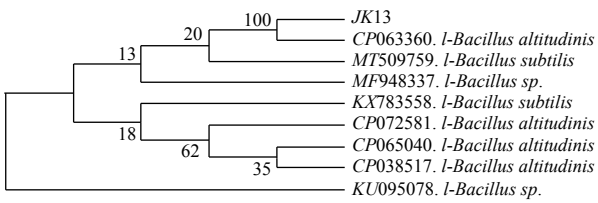


图 4 菌株 JK13 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain JK13

2.4 解钾菌培养条件优化

2.4.1 单因素筛选 不同培养条件下菌株 JK13 生长量差异显著（$P < 0.05$）（图 5）。碳源是微生物生长发育、新陈代谢的主要能量来源[29–30]，JK13 对葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇均能吸收利用，但以 0.5% 浓度的甘露醇为碳源时 OD_{600} 值显著高于其他碳源，菌株生长量最大（图 5a、b），生长情况最好；经单因素方差分析和 LSD 多重比较表明，0.5% 浓度的甘露醇与 1.5% 浓度之间存在显著差异。氮源在微生物生长过程中也发挥着重要的作用[31]，经单因素方差分析和 LSD 多重比较表明，以酵母粉为氮源时 JK13 菌液浓度显著高于其余 5 种氮源（$P < 0.05$）。对菌株 JK13 而言，氯化铵、硝酸钾、尿素 3 个处理之间无显著差异 ($P > 0.05$)；而氯化铵处理同硫酸铵、硝酸钾、尿素 3 个处理间呈显著差异，后三者之间则无显著差异（图 5c）。菌株 JK13 对 1.0% 浓度的酵母粉吸收利用效率更高，生长情况最好，而 0.75%、1.0%、1.25% 这 3 种浓度处理之间差异不显著（图 5d）。

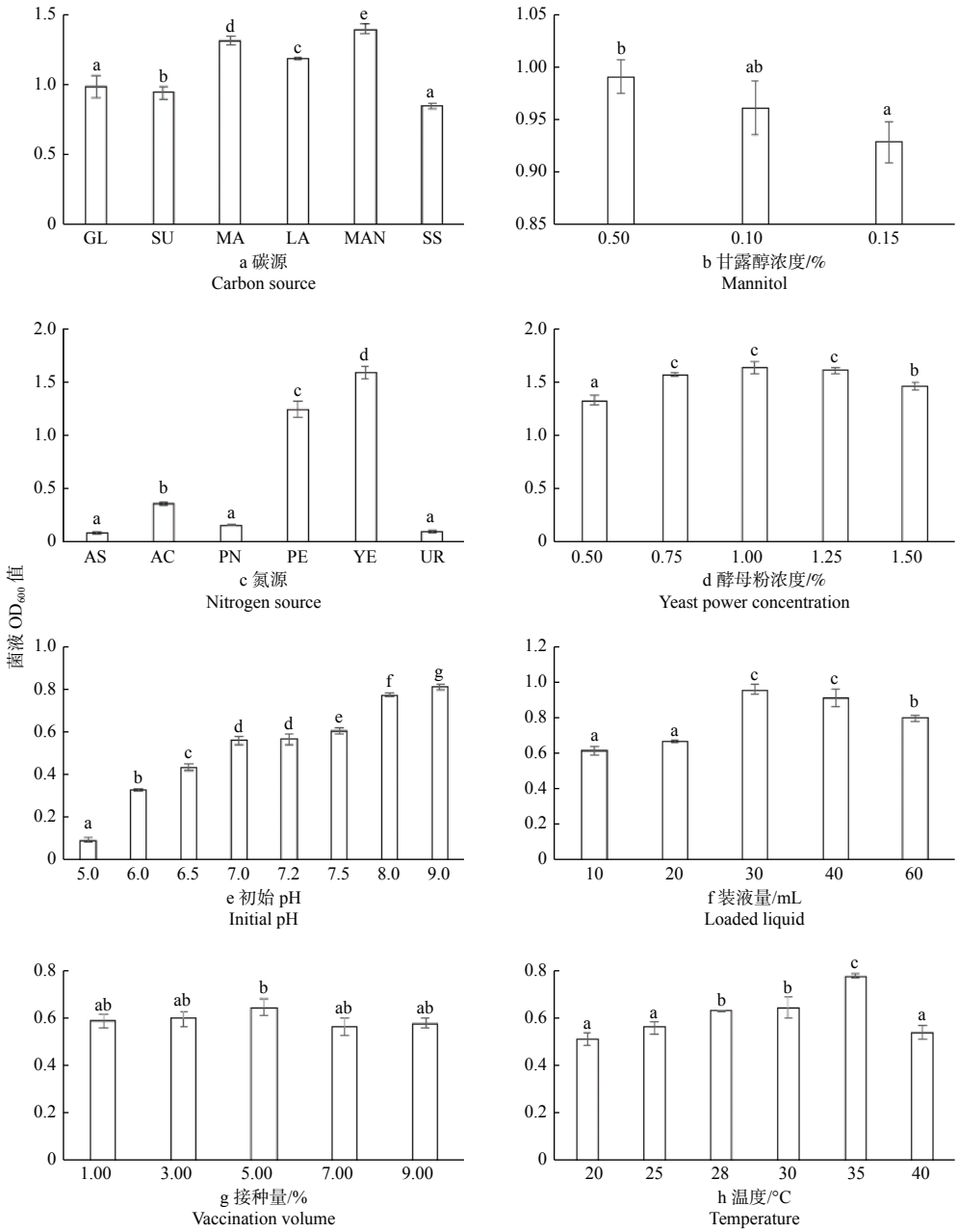
初始 pH 对菌株生长量影响差异性显著（$P < 0.05$）（图 5e），菌株 JK13 的最适 pH 值为 9.0，菌液 OD_{600} 值随 pH 的增加呈上升趋势；经单因素方差分析和 LSD 多重比较，pH 为 9.0 的处理同其余处理呈显著差异。不同菌株对氧气的需求量存在差异，摇瓶环境中氧气含量的多少是影响菌株生长速率的重要因素之一[32]。菌株 JK13 生长量在 30～40 mL 间无显著差异；30 mL 装液量与 10 mL、60 mL 处理间的差异达到显著水平（$P < 0.05$）（图 5f）。经单因素方差分析和 LSD 多重比较表明，JK13 的不同接种处理间差异并不显著（图 5g）。JK13 的最适温度范围为 28～35 ℃，但在 35 ℃ 处理下的菌液 OD_{600} 值显著高于其他温度处理（$P < 0.05$）（图 5h）。

2.4.2 正交试验 基于上述单因素实验，设计 4 因素（初始 pH、装液量、接种量、培养温度）3 水平正交试验（表 2）。其中因素 A 为初始 pH 值（7.5、8.0、9.0），因素 B 为装液量（20 mL、30 mL、40 mL），因素 C 为接种量（1%、3%、5%），因素 D 为培养温度（25℃、30℃、35℃）。极差分析结果为 $R_A > R_D > R_B > R_C$，表明对菌株 JK13 的菌体生长程度影响最大的因素为初始 pH 值，其次为培养温度、装液量、接种量。菌株 JK13 的最佳培养条件优化方案为 $A_3B_2C_1D_3$，即初始 pH 值为 9.0，装液量为 30 mL·100 mL^{-1}，接种量为 1%，培养温度为 35℃。菌株 JK13 在最佳优化方案下的菌液 OD_{600} 值为 1.059，其在未优化的普通培养条件下为 0.672，增长幅度为 57.56%。

3 讨论

现有研究表明，植物自身一般通过产生大量的 ABA、水分再分配[33]、动态改变根系内部基因[34]等应对不同的逆境胁迫，植物共生微生物则基于以上自我修复起到辅助和协同作用[35]，而微生物肥料的开发利用可以大大加速植物的逆境修复速度，为植物保持正常生理化学过程提供动力，发挥外在推动器的作用。

一般认为，生物的丰富的遗传多样性会为种间及种内个体间带来遗传分化与遗传差异，进而表现为生物培养特征的多样性。本实验从南方红壤区不同林龄杉木人工林下根际土壤筛选出的解钾菌菌落颜色具有多样性，呈现乳白色半透明、淡黄色，这与吴凡等[36]在桑树根际筛选出具有乳白色、淡黄色等颜色特征的解钾菌以及燕红等[37]在农田中筛选出呈乳白色的 K−6−4 和呈淡黄色的 K−1−1 的实验结果一致。但仅将菌落颜色作为解钾菌筛选的判



注：GL：葡萄糖；SU：蔗糖；MA：麦芽糖；LA：乳糖；MAN：甘露醇；SS：可溶性淀粉；AS：硫酸铵；AC：氯化铵；PN：硝酸钾；PE：蛋白胨；YE：酵母粉；UR：尿素。

GL: Glucose; SU: Sucrose: MA: Maltose; LA: Lactose; MAN: Mannitol; SS: Soluble starch; AS: Ammonium sulfate; AC: Ammonium Chloride; PN: Potassium nitrate; PE: Peptone; YE: yeast; UR: Urea

图 5　不同培养条件对菌株生长量的影响

Fig. 5　The influence of different culture conditions on the growth of strains

断标准并不严谨，据此并不能十分准确分离得到具备解钾能力的菌株，如狄义宁[38]在甘蔗根部筛选出菌落颜色为黄白色的解钾菌，姜霁航等[39]在苹果根际筛选出的解钾菌呈灰色、不透明。换而言之，种类各异的高效解钾菌菌落颜色也各不相同，因此，利用菌落颜色特征筛选解钾菌还需借助测定速效钾含量来做进一步判断。

土壤空间异质性为微生物多样性提供了生境基础，二者存在显著正相关关系[40]。在不同类型土壤中生存的解钾菌无论是在数量还在种类上均存在差异[41]，不同菌株的溶钾效果也存在差异。本实验在 20 株解钾菌中筛选出 13 株具解钾能力的菌株，最高效解钾菌JK13 发酵液可溶性钾含量为 81.06 $\mu g \cdot mL^{-1}$。吕睿等[8]在猕猴桃园农田中筛选出高效

表 2 菌株 JK13 培养条件的正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal test on culture condition for strain JK13

实验序号	A	B	C	D	OD_{600}
1	1（7.5）	1（20）	1（1）	1（25）	0.815
2	1（7.5）	2（30）	2（3）	2（30）	0.879
3	1（7.5）	3（40）	3（5）	3（35）	0.885
4	2（8.0）	1（20）	2（3）	3（35）	0.954
5	2（8.0）	2（30）	3（5）	1（25）	0.892
6	2（8.0）	3（40）	1（1）	2（30）	0.933
7	3（9.0）	1（20）	3（5）	2（30）	1.026
8	3（9.0）	2（30）	1（1）	3（35）	1.059
9	3（9.0）	3（40）	2（3）	1（25）	0.970
K_1	0.860	0.932	0.936	0.892	
K_2	0.926	0.943	0.934	0.946	
K_3	1.018	0.929	0.934	0.966	
R	0.158	0.014	0.002	0.074	
最优水平	3	2	1	3	
主次顺序	A>D>B>C				

注：k为均值，R 为极差。表中数据为3个重复的平均值。A：初始pH值；B：装液量，mL；C：接种量，%；D：温度，℃；OD_{600}：菌液OD_{600}值。

K means average, R means range. Data in tables are average values deviation on three times. A:Initial pH; B: Liquid medium volume; C: Inoculum concentration;D:Temperature;OD_{600}:OD_{600} value of bacterial liguid.

解钾菌株 JK3 的解钾量 3.7 μg·mL^{-1}，较空白对照组增加 94.74%，解钾量显著低于本实验筛选出的 JK13。闫雅楠等[9] 在入侵植物加拿大一枝黄花 (*Solidago canadensis* L.) 根际分离出的 15 株菌株中，9 株具有解钾能力，最优解钾菌株 H2−20 的解钾量为 10.657 μg·mL^{-1}，显著低于 JK13。陈易等[10] 在紫色土样中筛选出的 XD−K−2 菌株发酵液可溶性钾含量为 23.2 μg·mL^{-1}。对比上述研究，本实验筛选出的解钾菌（81.06 μg·mL^{-1}）具有显著解钾优势。此外，本实验所筛选出的不具备解钾能力的菌株占 35%，而李海龙等[42] 实验中不具解钾能力的菌株占 70%，相关研究表明，微生物的解钾能力受土壤类型、钾矿类型及含量、土壤 pH、土壤温度、环境中钾离子浓度、钾矿粉粒径大小等诸多因素的影响[43]，因此，进一步分析以不同植物为研究对象筛选出的解钾菌的解钾能力差异的原因，对于今后工程菌的普适性具有重要的参考价值。

经 16S rDNA 鉴定（见附图），JK13 为芽孢杆菌属（*Bacillus altitudinis*），而李海龙等[42] 在秦岭山区筛选出的 QL21、胡洲等[44] 在不同作物根际筛选出的 K1 和 K3、任建国等[45] 在太子参根际筛选出的 ATS−2−5 和 KTS−2−4 均亦属芽孢杆菌属，陈易等[10] 在紫色土中筛选出的 XD−K−2 为环状芽孢杆菌属（*Bacillus circulans* sp.），李新新等[46] 筛选出的 G4 为类芽孢杆菌属（*Paenibacillus* sp.），上述实验结果证明芽孢杆菌属微生物在硅酸盐细菌中占据较大比例，同时其促生、增产作用效果具有显著优势[44]。但随着研究的深入与展开，解钾菌大多局限于芽孢杆菌属这一结论[47] 被逐渐推翻，如张妙宜等[48] 在蓖麻根际筛选出的 MY−1 为嗜线虫赛雷氏菌（*Serratia nematodiphila*），陈丰宇等[49] 在香蕉根际筛选出的 1 株具解钾作用的放线菌为陕西链霉菌（*Streptomyces shaanxiensis*）。

现有研究认为解钾机制与产生有机酸、产胞外多糖、生物膜形成[50] 以及低分子能量酸性物质产生[51] 有关，但本实验中各菌株培养液 pH 值同可溶性钾含量无显著性相关关系，这与党雯[52] 得出的解钾能力强弱与 pH 相关性不显著的结论一致，据此推测产酸并不是硅酸盐细菌发挥解钾效用的主要因素，菌株可能是以破坏钾矿石晶体构造、表面接触发生交换作用等方式溶解无效钾。谷付旗等[53] 对菌株 WS-FJ9 的研究则表明解钾能力由多因素决定，解钾菌通过分泌有机酸、氨基酸来溶解缓效钾或利用氨基酸、有机酸、胞外的荚膜多糖三者络合作用促使钾源分解。基于以上分析，本实验筛选出的高效解钾菌 JK13 的具体解钾机制还有待结合苗期实验和分子手段进一步研究与验证。

4 结论

本实验基于亚历山大培养基筛选得到的高效解钾菌 JK13 具有较强的的解钾能力，经 16S rDNA 鉴定为芽孢杆菌属。采用单因素实验与正交设计实验优化其培养基组分及培养条件，即 0.5% 甘露醇、1.5% 酵母粉，初始 pH 值为 9，装液量为 30 mL·100 mL^{-1}，接种量为 1%，培养温度为 35℃。菌株的筛选和培养条件优化丰富了解钾微生物资源库，亦为林木附生功能菌的开发和利用提供了研究基础和数据支持。

参考文献：

[1] Leigh R. ,Wyn Jones R G. A hypothesis relating critical potassium concentrations for growth to the distribution and functions of this ion

in the plant cell[J]. The New Phytologist, 1984, 97(1): 1-13.

[2] Annum S, Muhammad N, Mohsin A, *et al*. Perspectives of potassium solubilizing microbes in sustainable food production system: A review[J]. Applied Soil Ecology, 2019, 133: 146-159.

[3] 李泽红, 李富佳, 董锁成, 等. 中国和白俄罗斯钾肥资源合作态势与潜力研究[J]. 资源科学, 2015, 37（6）：1295-1303.

[4] 朱永官, 彭静静, 韦　中, 等. 土壤微生物组与土壤健康[J/OL]. 中国科学: 生命科学: 1-11.

[5] Niu B, Paulson J N, Zheng X, *et al*. Simplified and representative bacterial community of maize roots[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017, 114(12): 2450-2459.

[6] 闫小娟, 李振轮, 谢德体, 等. 钾细菌对钾长石胶体吸附特性的影响研究[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2017, 39（2）：1-7.

[7] 万兵兵, 刘　晔, 吴　越, 等. 一株玉米根际多功能促生菌的筛选鉴定及效应研究[J]. 生物技术通报, 2016, 32（8）：169-176.

[8] 吕　睿, 李　博, 宋凤敏, 等. 解钾菌的分离、鉴定及解钾能力[J]. 江苏农业科学, 2016, 44（11）：471-475.

[9] 闫雅楠, 叶小齐, 吴　明, 等. 入侵植物加拿大一枝黄花根际解钾菌多样性及解钾活性[J]. 植物生态学报, 2019, 43（6）：543-556.

[10] 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.

[11] 范广阔, 邹双全, 林开敏, 等. 不同更新方式对杉木林土壤肥力的影响[J]. 福建林学院学报, 2009, 29（3）：210-214.

[12] 姚利辉, 康文星, 赵仲辉, 等. 会同杉木人工林不同生长阶段植物固碳特征[J]. 生态学报, 2015, 35（4）：1187-1197.

[13] Mengel K. Potassium in crop production[J]. Advances in Agronomy, 1980, 33: 59-110.

[14] 刘晓燕, 何　萍, 金继运. 钾在植物抗病性中的作用及机理的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2006（3）：445-450.

[15] Rehm G, Schmitt M. Potassium for Crop Production[D].Minneapolis:University of Minnesota,2002.

[16] 白　洋, 钱景美, 周俭民, 等. 农作物微生物组: 跨越转化临界点的现代生物技术[J]. 中国科学院院刊, 2017, 32（3）：260-265.

[17] 马天舒, 丁伟林, 肖复明, 等. 不同年龄阶段陈山红心杉人工林土壤理化性质[J]. 中南林业科技大学学报, 2020, 40（12）：114-124.

[18] 吴　凡, 林桂潮, 吴坚文, 等. 转AtPAP15基因大豆种植对根际土壤养分及酶活性的影响[J]. 土壤学报, 2013, 50（3）：600-608.

[19] 邱　权, 李吉跃, 王军辉, 等. 西宁南山4种灌木根际和非根际土壤微生物、酶活性和养分特征[J]. 生态学报, 2014, 34（24）：7411-7420.

[20] 中华人民共和国林业局. 森林土壤分析方法 (中华人民共和国林业行业标准)[S]. 北京: 中国标准出版社, 1999: 1-167.

[21] 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.

[22] 孙　科, 耿凤英, 于秋菊, 等. 牛蒡根际土壤中解钾菌筛选、鉴定及解钾条件优化[J]. 中国酿造, 2020, 39（10）：103-108.

[23] 吴红艳, 于　淼, 冯　健, 等. 土壤中解钾菌K02的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学杂志, 2020, 40（4）：60-65.

[24] 杜　雷, 王素萍, 陈　钢, 等. 一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017（3）：136-141.

[25] 骆韵涵, 柯志滨, 钟　超, 等. 红树林土壤解磷菌的分离鉴定及解磷特性[J]. 中国环境科学, 2020, 40（6）：2664-2673.

[26] 韩　梅, 王　东, 林荣峰, 等. 具有拮抗作用的硅酸盐细菌的分离与筛选[J]. 土壤通报, 2011, 42（1）：77-80.

[27] 张　薇, 黄建国, 袁　玲, 等. 外生菌根真菌对Al3 + 胁迫和低钾土壤的响应[J]. 环境科学, 2014, 35（10）：3862-3868.

[28] 朱舒亮, 刘胜亮, 祁先慧, 等. 新疆红枣PGPR解钾效果及其与有机酸的相关性研究[J]. 经济林研究, 2017, 35（3）：133-139.

[29] 马思佳, 顾卓江, 丁丽丽, 等. 碳源对活性污泥微生物细胞膜特性和群落结构影响[J]. 微生物学通报, 2017, 44（3）：561-573.

[30] 李　猛, 张恩平, 张淑红, 等. 长期不同施肥设施菜地土壤酶活性与微生物碳源利用特征比较[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23（1）：44-53.

[31] 崔艳荷, 张　威, 何红波, 等. 外源氮素添加对森林土壤氨基糖转化的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35（4）：960-965.

[32] 米前芬, 向玉萍, 王永敏, 等. 土生拉乌尔菌TGRB3的生物学特性及其不同氧气浓度条件下的汞甲基化[J]. 环境科学学报, 2019, 39（7）：2240-2248.

[33] 张金林, 李惠茹, 郭姝媛, 等. 高等植物适应盐逆境研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24（12）：220-236.

[34] 李　斌, 黄　进, 王　丽, 等. 环境胁迫及相关植物激素在水稻根毛发育过程中的作用[J]. 中国水稻科学, 2020, 34（4）：287-299.

[35] 李　乐, 孙　海, 刘政波, 等. 微生物肥料的作用、机理及发展方向[J]. 东北农业科学, 2016, 41（4）：63-69.

[36] 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.

[37] 燕　红, 于彩莲, 包　鑫, 等. 高效解磷兼解钾活性菌株分离筛选的初步研究[J]. 扬州大学学报:农业与生命科学版, 2016, 37（01）：81-85,90.

[38] 狄义宁, 刘鲁峰, 胡一凡, 等. 甘蔗内生菌B9的鉴定及其促生长机制和定殖能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2019（3）：186-193.

[39] 姜霁航, 彭霞薇, 颜振鑫, 等. 苹果树根际高效解钾菌的筛选及鉴定[J]. 中国农业气象, 2017, 38（11）：738-748.

[40] 曹　鹏, 贺纪正. 微生物生态学理论框架[J]. 生态学报, 2015, 35（22）：7263-7273.

[41] 许景钢, 孙　涛, 李　嵩. 我国微生物肥料的研发及其在农业生产中的应用[J]. 作物杂志, 2016（1）：1-6.

[42] 李海龙, 谷　洁, 张宏斌, 等. 秦岭山区硅酸盐细菌的分离、筛选以及初步鉴定[J]. 西北农业学报, 2011, 20（4）：194-199.

[43] 盛下放, 黄为一. 硅酸盐细菌NBT菌株释钾条件的研究[J]. 中国农业科学, 2002（6）：673-677.

[44] 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.

[45] 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.

[46] 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, 51（2）：381-388.

[47] 谷付旗, 季秀玲, 魏云林. 土壤硅酸盐细菌的研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25（5）：609-611,616.

[48] 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.

[49] 陈宇丰, 柯春亮, 周登博, 等. 香蕉根际土壤解钾放线菌的筛选鉴定及解钾特性研究[J]. 生物技术通报, 2015, 31（6）：129-137.

[50] 林 英, 司春灿, 章慧璇. 解钾微生物研究现状及其在农业生产中的应用和展望[J]. 江苏农业科学, 2020, 48（12）：1-5.

[51] Malinovskaya I M, Kosenko L V, Votselko S K, *et al*. Role of Bacillus mucilaginosus polysaccharide in degradation of silicate minerals[J]. Microbiology, 1990, 59(1): 49-55.

[52] 党 雯. 解钾菌的筛选及其对矿区复垦土壤肥力的影响[D]. 太原: 山西大学, 2015.

[53] 李冠喜, 吴小芹, 叶建仁. 多噬伯克霍尔德氏菌WS-FJ9磷酸酶产生的细胞定位及营养条件优化[J]. 江西农业大学学报, 2014, 36（6）：1357-1361.

Screening, Identifying and Optimizing the Culture Conditions of High-efficiency Potassium-solubilizing Bacteria in the Rhizosphere of *Cunninghamia lanceolata* in Red Soil Area of South China

ZHAO Jun[1,3], *RAO Hui-ling*[1,3], *FENG Qing-yu*[1,3], *HUANG Wei*[1,3], *WU Cheng-zhen*[2,3], *LI Jian*[1,3]

(1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China; 2. College of Ecology and Resource Engineering, Wuyi University, Nanping 354300, Fujian, China; 3. Key Laboratory for Forest Ecosystem Process and Management of Fujian Province, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China)

Abstract: [**Objective**] To screen, identify and optimize the culture conditions of high-efficiency potassium-solubilizing bacteria strains in low-potassium-stressed rhizosphere soil of *Cunninghamia lanceolata* plantations in red soil area of south China. [**Method**] 79 potassium-solubilizing strains were screened from the rhizosphere soil under 2-, 4-, 10- and 15-years-old *C. lanceolata* plantations, and 20 dominant strains were selected according to their morphological and growth characteristics. The soluble potassium content and potassium-solubilizing rate of fermentation fluid were screened out for an optimal potassium-resolving strain and the genus was determined by 16S rDNA identification. The culture medium components and culture conditions of the high-efficiency potassium-solubilizing strain were optimized by single-factor experiments and orthogonal tests. [**Result**] (1) Among the 20 potassium-solubilizing bacteria strains, the potassium-releasing rate of 13 strains was positive, the potassium-solubilizing bacteria effectively decomposing potassium-feldspar accounted for 65%. (2) strain JK13, identified as *Bacillus altitudinis*, was identified as the best potassium-solubilizing bacterium, and its fermentation liquid soluble potassium content was 81.06 $\mu g \cdot mL^{-1}$, with a potassium solution rate of 60.49%, significantly higher than that of the other strains ($P<0.05$). (3) The results of single-factor experiment and orthogonal test showed that the strain JK13 had an initial pH of 9, a liquid loading of 30 $mL \cdot 100\ mL^{-1}$, an inoculation of 1%, and a culture temperature of 35℃ when the value of the liquid OD_{600} was significantly higher than the CK ($P<0.05$). [**Conclusion**] Strain JK13, which belongs to the genus *B. altitudinis*, shows an efficient ability to dissolve potassium, and after optimization, 0.5% mannitol and 1.5% yeast powder are the most suitable medium components, the culture conditions are weak alkali, high temperature, which can significantly improve the growth of the strains.

Keywords: *Cunninghamia lanceolata*; potassium-solubilizing bacteria; screening and identification; optimization of culture condition

附录

CTGGCTCATAAAGGTTACCTCACCGACTTCGGGTGTTGCAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGT
ACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCA
GTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGAACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTAAACCTTGCGGTCTCGC
AGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTC
ATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCACCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAA
GATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC
ACCACCTGTCACTCTGTCCCCGAAGGGAAAGCCCTATCTCTAGGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACCTG
GTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTC
CTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAG
GGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGT
TCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTC
CTCCACATCTCTACGCATTTCACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCCTCTTCTGCACTCAAGTTTCC
CAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGCCTGCGAG
CCCTTTACGCCCAATAATTCCGGACAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGT
TAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGTACCGTCAAGGTGCAAGCAGTTACTCTTGCACTTGTTCTTCCCTAA
CAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCATCACTCACGCGGCGTTGCTCCGTCAGACTTTCGTCCAT
TGCGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGAT
CACCCTCTCAGGTCGGCTACGCATCGTCGCCTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTAGCTAATGCGCC
GCGGGTCCATCTGTAAGTGACAGCCGAAACCGTCTTTCATCCTTGAACCATGCGGTTCAAGGAACTAT
CCGGTATTAGCTCCGGTTTCCCGGAGTTATCCCAGTCTTACAGGCAGGTTACCCACGTGTTACTCACC
CGTCCGCCGCTAACATCCGGGAGCAAGCTCCCTTCTGTCCGCTCGACTTGC

图 附图　JK13 菌株 16S rDNA

（责任编辑：崔　贝）